



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**RENATO CHAVES SOUTO BRANCO**

**DESNUTRIÇÃO PROTEICA IMPEDE OS EFEITOS  
DA TAURINA SOBRE O MECANISMO DE SECREÇÃO E  
AÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS OBESOS:  
PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR DE TAURINA**

**PROTEIN MALNUTRITION PREVENTS THE  
EFFECTS OF TAURINE ON SECRETION AND ACTION  
OF INSULIN IN OBESE MICE: PARTICIPATION OF THE  
TAURINE TRANSPORTER**

Campinas

2016

**RENATO CHAVES SOUTO BRANCO**

**DESNUTRIÇÃO PROTEICA IMPEDE OS EFEITOS  
DA TAURINA SOBRE O MECANISMO DE SECREÇÃO E  
AÇÃO DA INSULINA EM CAMUNDONGOS OBESOS:  
PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR DE TAURINA**

**PROTEIN MALNUTRITION PREVENTS THE  
EFFECTS OF TAURINE ON SECRETION AND ACTION  
OF INSULIN IN OBESE MICE: PARTICIPATION OF THE  
TAURINE TRANSPORTER**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como parte  
dos requisitos exigidos para a obtenção do Título  
de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na  
área de concentração de Fisiologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the  
University of Campinas in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of Doctor in  
Functional and Structural Biology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO RENATO CHAVES SOUTO BRANCO E  
ORIENTADA PELO DOUTOR EVERARDO  
MAGALHÃES CARNEIRO.

Orientador: Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Campinas

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2011/20196-1

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B732d Branco, Renato Chaves Souto, 1986-  
Desnutrição proteica impede os efeitos da taurina sobre o mecanismo de secreção e ação da insulina em camundongos obesos : participação do transportador de taurina / Renato Chaves Souto Branco. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Desnutrição. 3. Taurina. 4. Insulina - Secreção. 5. Insulina - Metabolismo. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Protein malnutrition prevents the effects of taurine on secretion and action of insulin in obese mice : participation of the taurine transporter

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Malnutrition

Taurine

Insulin - Secretion

Insulin – Metabolism

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Rui Curi

Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Carmen Veríssima Ferreira Halder

**Data de defesa:** 29-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de Agosto de 2016.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Presidente da Comissão Examinadora)

Prof. Dr. Rui Curi

Prof.(a) Dr(a). Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Prof.(a) Dr(a). Helena Cristina dDe Lima Barbosa  
Sampaio

Prof.(a) Dr(a). Carmen Verissima Ferreira Halder

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais e demais membros da família que sempre me apoiaram durante toda a jornada até chegar a este momento. Agradeço em especial a minha mãe Silvia, meu pai Paulo, meu irmão Guilherme e minha ex-companheira Natalia por todo o esforço tomado durante esses anos para que eu pudesse buscar esse objetivo em minha vida.

Agradeço ao professor Everardo Magalhães Carneiro por ter aberto as portas de seu laboratório e por ter me orientado e dado todo o suporte ao longo desses 4 (quatro) anos de trabalho. Em seu grupo de pesquisa consegui crescer como pesquisador e amadurecer minha visão quanto ao que de fato é ser um cientista.

Agradeço ao professor Antônio Carlos Boschero por ter sido por ter contribuído com toda sua experiência e conhecimento em nossos trabalhos e projetos buscando sempre deixá-los o melhor possível.

Agradeço aos professores Antonio Luiz Cuesta-Muñoz e Jens H. Nielsen e todo seu grupo da Universidade de Copenhague – Dinamarca - pela incrível receptividade durante todo meu período de estágio em seu laboratório e pela oportunidade de colaborar em seus projetos. Agradeço por todos os ensinamentos, os quais levarei para o resto da minha vida profissional.

Agradeço ao Dr. Cláudio Zoppi por sua sempre presente contribuição para o direcionamento de nossos projetos e trabalhos, mostrando sempre uma saída quando as possibilidades de resposta parecem ter se extinguido.

Agradeço aos demais companheiros e amigos que desprenderam muitas horas de suas vidas a fim de possibilitar a realização deste trabalho: Thiago, Rafael, Junia, Jean, Patrícia e Gabriel.

Agradeço à bióloga Marise Carnelossi Brunelli pelo indispensável esforço para a aquisição de reagentes e sua contribuição fundamental para o melhor andamento de todos os projetos de nosso grupo.

Agradeço à **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudos e por seu apoio nos demais projetos do laboratório.

## RESUMO

A desnutrição proteica foi associada ao desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) na vida adulta. A obesidade e DM2 estão associadas com disfunção na secreção/ação da insulina, o que está correlacionado com resistência periférica à ação do hormônio, disfunção das células beta-pancreáticas, tais como alterações na produção de fatores de acoplamento metabólico (MCFs) e biogênese mitocondrial. A suplementação com taurina (TAU) restaura alterações morfo-fisiológicas, em células beta-pancreáticas e em tecido muscular esquelético em modelos de obesidade induzida por dieta; entretanto, estes efeitos são perdidos em roedores desnutridos e alimentados com dieta rica em gordura (HFD). Nós investigamos os mecanismos funcionais e moleculares envolvidos na produção dos MCFs e biogênese mitocondrial em células beta-pancreáticas de camundongos desnutridos alimentados com HFD. Secundariamente, investigamos os possíveis mecanismos associados à ausência de efeitos da suplementação com TAU nesse modelo experimental. Para isso, alimentamos, após o desmame, camundongos C57BL/6 com dieta controle (14% de teor proteico - C) ou dieta-restrita (6% de teor proteico - R) por 6 semanas. Após esse período, os camundongos de ambos os grupos foram alimentados com HFD (CH e RH) por 8 semanas, acompanhados ou não de suplementação com 5% de TAU na água de beber, após o desmame (CHT e RHT). HFD induziu intolerância à glicose e resistência periférica à insulina em ambos os grupos, alimentados com dieta controle ou restrita. Além disso, HFD aumentou a secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) em ilhotas pancreáticas isoladas de CH e RH. Esse aumento foi associado a maior expressão da enzima piruvato carboxilase (PYC) e produção de NADPH. A suplementação com TAU preveniu esse aumento na SIIG, modulando expressão de (PYC) e produção de NADPH, somente em animais CHT. A incapacidade da TAU em reverter essas alterações em RHT foi associada a menor expressão do Transportador de TAU e níveis de TAU em ilhotas pancreáticas quando comparado a CH e CHT. Em conclusão, HFD induziu aumento na secreção de insulina induzida por glicose por aumentar a expressão da PYC bem como os níveis de NADPH. TAU previniu essas alterações através da modulação da expressão da PYC. A desnutrição proteica impediu a ação da TAU sobre tais parâmetros. Tais efeitos foram associados a redução no transporte de TAU em ilhotas pancreáticas.

## ABSTRACT

Protein malnutrition has been linked to the development of obesity as well as type 2 diabetes (T2DM) in adult life. Both disorders are associated with the dysfunction of secreting and acting processes of insulin, which is related to malfunction of insulin-producing cells metabolism, showing impaired metabolic coupling factors (MCFs) production, and the resistance of peripheral tissues to its action. Taurine (TAU) supplementation restores morpho-physiological alterations in pancreatic beta-cells and in skeletal muscle in animal obese models; however, these effects are blunted in protein malnourished rodents fed a high-fat diet (HFD). We investigated the molecular and functional mechanism associated with the generation of MCFs and mitochondrial biogenesis in beta-cells of malnourished obese mice. Moreover, we investigated the mechanism possibly involved with the absence of effects of TAU supplementation in this experimental model. Thus, C57BL/6 mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet for 6 weeks. Afterward, mice received a high-fat diet (HFD) for 8 weeks (CH and RH) with or without 5% TAU supplementation after weaning on their drinking water (CHT and RHT). HFD led to glucose intolerance and peripheral insulin resistance in both groups, CH and RH. In addition, HFD increased glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in isolated pancreatic islets of the same groups. This increment was associated with increased in pyruvate carboxylase (PYC) protein expression and generation of NADPH. TAU supplementation prevented this increment on GSIS, by modulation PYC expression as well as NADPH production only in CHT pancreatic islets. The lack of effects of TAU supplementation was most likely due to alteration of TAU transport, since Taurine Transporter expression has not been increased in RHT mice as observed in CHT. In conclusion, HFD led to increment on PYC expression and NADPH levels, which was associated with increased glucose-stimulated insulin secretion in normal- and protein-restricted obese mice. Moreover, TAU prevented this outcome in CHT mice only. Protein malnutrition followed by HFD feeding impairs this effect due to reduced Taurine Transporter expression in pancreatic islets.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Artigo 1

**Table 1.** Taurine prevented weight gain, fat accumulation, hyperglycemia and hyperinsulinemia in control mice fed a HFD

**Figure 1.** Taurine prevented increased glucose-stimulated insulin secretion as well as NADPH fluorescence levels in control mice fed a HFD

**Figure 2.** Taurine prevented increment in glucokinase and pyruvate carboxylase protein expression in control mice fed a HFD

**Figure 3.** Inhibition of pyruvate carboxylase prevented increment on glucose-stimulated insulin secretion induced by HFD

**Figure 4.** Taurine prevented increment on PGC-1 $\alpha$  and Tfam protein expression in control mice fed a HFD

**Figure 5.** HFD increased Taurine transporter protein expression, pancreatic islets' Taurine content and plasma interleukin-6 levels

**Figure 6.** Interleukin-6 increases Taurine transporter protein expression in isolated pancreatic islets

### Artigo 2

**Figura 1.** Taurina preveniu intolerância à glicose e à insulina induzida por dieta rica em gordura em CHT

**Figura 2.** Taurina preveniu redução da sensibilidade muscular à insulina apesar do maior acúmulo de triacilgliceróis em CHT

**Figura 3.** Taurina preveniu redução na expressão de enzimas do metabolismo glicolítico e mitocondrial em CHT

**Figura 4.** Dieta rica em gordura reduziu os níveis de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos

**Figura 5.** Taurina aumenta a fosforilação de AMPK e ACC em músculo gastrocnêmio

**Figura 6.** Taurina não reverte o quadro de inflexibilidade metabólica induzida por dieta rica em gordura



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIN – instituto americano de nutrição  
AKT – Proteína homóloga ao oncogene do timoma viral  
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP  
ANOVA – Análise de variância  
ATP – Trifosfato de adenosina  
AUC – Area under curve  
BW – Body weight  
DM2 – Diabetes mellitus tipo 2  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
GCK – Glucokinase  
GLUT2 – Transportador de glicose 2  
GLUT4 – Transportador de glicose 4  
GTT – Teste de tolerância a glicose  
HFD – High-fat Diet  
IL-6 – Interleukin 6  
iNOS – nitric oxide synthase  
IR – Receptor de insulina  
IRS-1 – Substrato 1 do receptor de insulina  
ITT – Teste de tolerância a insulina  
KATP – Canal de K<sup>+</sup> sensível ao ATP  
MCF – Fatores de acoplamento metabólico  
mTOR – Alvo mecanístico da rapamicina  
NEFA – Non-sterified fatty acid  
NO – Óxido Nítrico  
Ob – Camundongos obesos deficientes em Leptina  
PAA – Ácido fenilacético  
PDX-1 – Homeobox duodenal e pancreático  
PGC-1 $\alpha$  - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha  
PI3K – Fosfatidil inositol 3-quinase  
PKA – Proteína Quinase dependente de AMPc  
PKC – Proteína Quinase C  
PYC – Piruvato Carboxilase

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3

TAG – Triacilglicerol

TAU – Taurine/Taurina

Tau-T – Taurine Transporter

TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

Tfam – Fator transcricional mitocondrial A

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alfa

## SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 A SECREÇÃO DE INSULINA.....	14
1.2 OS MECANISMOS INDEPENDENTES DOS CANAIS $K^{+}_{ATP}$ ENVOLVIDOS NA SECREÇÃO DE INSULINA: O PAPEL DAS MITOCÔNDRIAS.....	15
1.3 MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS MCFs E DA SECREÇÃO DA INSULINA NA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E OBESIDADE .....	17
1.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL E RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA.....	19
1.5 A TAURINA .....	21
<b>2) OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1) GERAIS .....	23
2.1.1. ESTUDO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS .....	23
2.1.2. ESTUDO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	23
<b>3) ARTIGO 1.....</b>	<b>25</b>
<b>PROTEIN MALNUTRITION IMPAIRS TAURINE REESTABLISHMENT OF GLUCOSE-STIMULATED INSULIN SECRETION INDUCED BY A HIGH-FAT DIET DUE TO THE LACK OF INCREMENT IN THE EXPRESSION OF TAURINE-TRANSPORTER PROTEIN.....</b>	<b>25</b>
ABSTRACT .....	27
INTRODUCTION .....	28
MATERIALS AND METHODS.....	29
<i>Reagents and Diet Composition.....</i>	<i>29</i>
<i>C57/BL6 Mice .....</i>	<i>29</i>
<i>Nutritional Status Assessment .....</i>	<i>30</i>
<i>Insulin secretion.....</i>	<i>31</i>
<i>Total DNA Content.....</i>	<i>31</i>
<i>NAD(P)H fluorescence.....</i>	<i>31</i>
<i>Measurement of Taurine Content in Pancreatic Islets.....</i>	<i>32</i>
<i>Western blot analysis .....</i>	<i>32</i>
<i>Statistical analysis.....</i>	<i>33</i>
RESULTS .....	33

<i>Taurine prevented weight gain, fat accumulation, hyperglycemia and hyperinsulinemia in control mice fed a HFD.....</i>	33
<i>Taurine prevented increased glucose-stimulated insulin secretion as well as NADPH fluorescence levels in control mice fed a HFD.....</i>	33
<i>Taurine prevented increment in glucokinase and pyruvate carboxylase protein expression in control mice fed a HFD .....</i>	34
<i>Inhibition of pyruvate carboxylase prevented increment on glucose-stimulated insulin secretion induced by HFD.....</i>	35
<i>Taurine prevented increment on PGC-1<math>\alpha</math> and Tfam protein expression in control mice fed a HFD .....</i>	37
<i>HFD increased Taurine transporter protein expression, pancreatic islets' Taurine content and plasma interleukin-6 levels.....</i>	38
<i>Protein expression profile in pancreatic islets from leptin-deficient mice (Ob) supplemented or not with TAU.....</i>	39
<i>Interleukin-6 increases Taurine transporter protein expression in isolated pancreatic islets.....</i>	40
DISCUSSION .....	40
ACKNOWLEDGEMENTS.....	43
LEGENDS.....	44
<b>4) ARTIGO 2.....</b>	<b>52</b>
<b>DESNUTRIÇÃO PROTEICA IMPEDE A RESTAURAÇÃO DA SENSIBILIDADE MUSCULAR À INSULINA INDUZIDA POR TAURINA VIA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PIRUVATO CARBOXILASE E DOS NÍVEIS DE OXALACETATO EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS E ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA .....</b>	<b>52</b>
INTRODUÇÃO .....	53
OBJETIVO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
<i>Animais.....</i>	55
<i>Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) .....</i>	56
<i>Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) .....</i>	56
<i>Determinação da taxa respiratória de camundongos/Avaliação da taxa metabólica basal (Respirometria).....</i>	56

<i>Determinação da concentração de metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos</i> .....	56
<i>Determinação da concentração de proteína e triacilgrlicerois totais músculo gastrocnêmio</i> .....	57
<i>Western Blot</i> .....	57
<i>Análise estatística</i> .....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	57
<i>Taurina preveniu intolerância à glicose e à insulina induzida por dieta rica em gordura em CHT</i> .....	57
<i>Taurina preveniu redução da sensibilidade muscular à insulina apesar do maior acúmulo de triacilgliceróis em CHT</i> .....	59
<i>Taurina preveniu redução na expressão de enzimas do metabolismo glicolítico e mitocondrial em CHT</i> .....	60
<i>Dieta rica em gordura reduziu os níveis de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos</i> .....	61
<i>Taurina aumenta a fosforilação de AMPK e ACC em músculo gastrocnêmio</i> .....	62
<i>Taurina não reverte o quadro de inflexibilidade metabólica induzida por dieta rica em gordura</i> .....	63
<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>5) CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79
<b>6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82

## 1) INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde (OMS), a prevalência de obesidade vem aumentando ao longo das últimas décadas ao redor do mundo. Já em 2008, mais de 1,4 bilhões de pessoas com mais de 20 anos de idade apresentavam sobrepeso e dessas, cerca de 10% eram obesas. Em 2013, um estudo desenvolvido em 188 países apontou que 2,1 bilhões de pessoas, ou seja, 30% da população mundial apresentava sobrepeso ou obesidade (Ng *et al.*, 2014). Essa tendência também é observada entre crianças e os valores são alarmantes. Projeções apontam que em 2020 cerca de 9% das crianças em idade pré-escolar serão sobrepesadas ou obesas (De Onis *et al.*, 2010). Os dados atuais, mostram que independentemente da nação, desenvolvida, em desenvolvimento ou sub-desenvolvida, todas falharam em reduzir a prevalência de obesidade nas últimas 3 décadas (Ng *et al.*, 2014).

Comumente a obesidade está associada a outras patologias como, hipertensão arterial, desordens cardíacas, problemas respiratórios, artrite, doença circulatória venosa, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), não dependente de insulina e, alguns tipos de câncer (Eckersley, 2001; Grundy *et al.*, 2004). O DM2 caracteriza-se pelo quadro de hiperglicemia que resulta de uma disfunção das ilhotas pancreáticas, que se manifesta como a secreção de insulina prejudicada diante do quadro de resistência a este hormônio (Kahn, 2003).

Outro fator de risco que ainda atinge inúmeros países, especialmente pobres e em desenvolvimento, é a má nutrição em crianças. Embora, segundo a OMS, a prevalência de desnutrição vem reduzindo em países que enfrentam o problema, cerca de 95 milhões de crianças abaixo dos cinco anos de idade estavam desnutridas em 2014. Uma série de estudos epidemiológicos apontam que má nutrição especialmente em fases iniciais do desenvolvimento estão associadas com maior risco de desenvolvimento de obesidade e DM2 na vida adulta (Ravelli *et al.*, 1998; Ozanne and Hales, 2002). Hales & Barker (2001) postularam a hipótese do fenótipo econômico, na qual afirmam que diante de exposições a restrição nutricional, alterações na homeostase glicêmica, possivelmente permanentes, favoreceria, em um primeiro momento, o fornecimento de nutrientes para tecidos periféricos sem afetar glicemia e composição corporal (Hales and Barker, 2001). O pâncreas endócrino é especialmente afetado por tais adaptações, levando ao desenvolvimento inapropriado das células beta-pancreáticas, produtoras de insulina, o que favoreceria o desenvolvimento futuro do DM2 (Hales and Barker, 1992).

### 1.1 A secreção de insulina

A secreção de insulina é induzida por diversos nutrientes, neurotransmissores e hormônios peptídicos. No entanto, seu principal secretagogo é a glicose (Gao *et al.*, 2003;

Macdonald *et al.*, 2005). As células beta-pancreáticas funcionam como sensores de glicose do organismo, modulando de maneira fina a secreção de insulina em função das variações na concentração de glicose plasmática.

A secreção de insulina em resposta a glicose apresenta uma característica bifásica. A primeira fase acontece minutos após o início da estimulação, cessando logo em seguida. Atualmente acredita-se que o mecanismo dependente dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{+ATP}$ ) seja o principal responsável pela modulação desta fase. A segunda fase da secreção do hormônio, por outro lado, começa algum tempo depois do final da primeira e tem como característica um aumento gradual da secreção da insulina até seu auge. Essa etapa da secreção da insulina é marcadamente mais longa (Straub and Sharp, 2004) e mecanismos denominados independentes dos canais de  $K_{+ATP}$  são postulados como os principais responsáveis pela manutenção desse processo (Maechler *et al.*, 2006). Neste sentido a mitocôndria, importante organela do metabolismo energético intracelular, tem papel de destaque.

### **1.2 Os mecanismos independentes dos canais $K_{+ATP}$ envolvidos na secreção de insulina: o papel das mitocôndrias**

Nas células beta pancreáticas, as mitocôndrias possuem papel fundamental na integração e na geração de diversos fatores de acoplamento metabólico (MCFs). O acoplamento entre a glicólise, e o metabolismo mitocondrial nessas células é favorecido pela baixa atividade da lactato desidrogenase (LDH), que converte o piruvato (produto final da glicólise) em lactato no citosol, o que faz desta enzima, um importante passo modulatório para a secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) (Sener *et al.*, 2001). Assim, a elevada produção dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) nas células  $\beta$  do pâncreas foi associada com aumento na produção oxidativa de energia e secreção de insulina (Fransson *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2008). Apesar do importante papel do ATP, a regulação da secreção de insulina por outros MCFs, incluindo malonil-CoA, NADPH, glutamato e diacilglicerol também foi demonstrada, sugerindo a existência de um processo complexo para o ajuste fino da regulação da secreção de insulina (Macdonald *et al.*, 2005; Jitrapakdee *et al.*, 2010; Maechler, 2013). Neste sentido, uma série de lançadeiras que atuam na amplificação da SIIG através da síntese dos MCFs, já foram propostas (Macdonald *et al.*, 2005). O aumento na razão  $NADH:NAD^+$  citosólico ocasionando inibição da glicólise, aliado à baixa expressão da LDH nas células beta pancreáticas, faz com que estas células possuam alta atividade de duas lançadeiras para regenerar  $NAD^+$  no interior das mitocôndrias. Com papel importante nesse processo, às lançadeiras de glicerol-3-fosfato e a malato-aspartato

parecem atuar de forma sinérgica (Eto *et al.*, 1999). Apesar de papel de destaque, essas não são as únicas, mas outras lançadeiras também desempenham papel na regulação da secreção de insulina induzida por glicose (SIIG). Uma série de lançadeiras dependentes de piruvato como a piruvato-malato, piruvato-isocitrato e principalmente a piruvato-citrato são propostas na literatura (Macdonald *et al.*, 2005; Prentki *et al.*, 2013). Estas lançadeiras amplificariam o sinal da SIIG através do aumento na concentração dos MCFs, acoplando o metabolismo da glicose à secreção de insulina. A enzima mitocondrial piruvato carboxilase (PYC) tem papel fundamental nesse processo e a sua importância para o processo de secreção de insulina ganhou destaque nos últimos anos (Farfari *et al.*, 2000; Fransson *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Alterações na atividade ou expressão da PYC foram associadas a alterações na produção de citrato, oxalacetato e malato, refletindo em alterações na SIIG (Liu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008).

Outro MCF relevante para a modulação da SIIG pelas células beta pancreáticas é o NADPH. Nessas células, as lançadeiras mitocondriais, parecem desempenhar papel importante na produção de NADPH (Farfari *et al.*, 2000). A exportação de citrato a partir da mitocôndria serve como um sinal de abundância de substratos energéticos, participando do processo de acoplamento estímulo-secreção de insulina. Uma vez no citosol, os ciclos de metabólitos dos quais o citrato participa produzem NADPH (Farfari *et al.*, 2000). Esse MCF começou a ganhar destaque como fator de acoplamento metabólico a mais de três décadas (Watkins, 1972; Watkins and Moore, 1977). Entretanto, experimentos mais recentes deram suporte a essas propostas mostrando a extrusão direta de grânulos contendo insulina após o fornecimento de NADPH as células beta pancreáticas (Ivarsson *et al.*, 2005). Além disso, a razão NADPH/NADP<sup>+</sup> medeia a rápida inativação de canais de potássio, regulando canais do tipo Kv2.1, favorecendo a secreção de insulina (Macdonald *et al.*, 2003). Ainda, o silenciamento da expressão gênica da PYC reduz drasticamente a razão NADPH/NADP<sup>+</sup> em linhagem de células beta INS-1 e células beta pancreáticas de ratos. Por outro lado, a superexpressão dessa enzima aumentou essa razão sugerindo um possível ponto de modulação da SIIG envolvendo a PYC e NADPH (Xu *et al.*, 2008). Esses dados reforçam a papel fundamental desta enzima na modulação da SIIG.

Não somente o metabolismo mitocondrial e sua relação com a SIIG tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos, mas também a relação entre massa, número e taxa de biogênese mitocondrial vem ganhado destaque. Biogênese mitocondrial em resposta a estímulos ambientais/nutricionais tal como a desnutrição é uma adaptação intracelular importante. Entretanto, esse processo e sua relação com a modulação da SIIG em ilhotas



pancreáticas não estão totalmente esclarecidos e ainda é alvo de muitas controvérsias. Cheng e colaboradores (Cheng *et al.*, 2010), mostraram que a redução na expressão de Fator Induzível por Hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), em ilhotas pancreáticas de camundongos e humanos, está associada à redução de enzimas importantes para o metabolismo glicolítico, da produção de ATP e consequentemente com a redução da SIIG. Semelhantemente, a redução da expressão de ARNT1 (também conhecido como HIF-1 $\beta$ ) leva a redução da expressão de PGC-1 $\alpha$  (do inglês, Peroxisome activator proliferator-activated receptor gamma coactivator 1  $\alpha$ ), HIF-1 $\alpha$ , glicoquinase, PYC, piruvato desidrogenase, bem como diversos fatores de acoplamento metabólico os quais estão associados a modulação da SIIG (Pillai *et al.*, 2011). Esses achados são reforçados por dados mostrando que o silenciamento da expressão do Tfam (do inglês, Transcriptor fator A), e a redução na expressão do PGC-1 $\alpha$  foi associada à redução na secreção de insulina no DM2 (Silva *et al.*, 2000; Patti *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2008; Gauthier *et al.*, 2009). Esse tema é alvo de controvérsias uma vez que foi proposto que a atividade do PGC-1 $\alpha$  pode reduzir a SIIG. Este efeito parece estar associado ao aumento da expressão da UCP2 o que por sua vez reduz a produção de ATP e consequentemente a secreção de insulina (Yoon *et al.*, 2003; Oberkofler *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010).

### **1.3 Modulação da produção dos MCFs e da secreção da insulina na desnutrição protéica e obesidade**

A restrição protéica precoce leva a uma redução da SIIG (Arantes *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2013). Nosso grupo de pesquisa e outros vêm contribuindo significativamente com dados nesta área, mostrando uma série de alterações moleculares induzidas por dieta hipoprotéica, associadas à redução na SIIG (Zoppi *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2011). No entanto, as alterações nos mecanismos metabólicos de controle da SIIG, em condições de desnutrição protéica, permanecem pouco conhecidas.

Recentes pesquisas sobre o tema mostraram que a desnutrição protéica induz alterações já na fase inicial da regulação metabólica da SIIG, reduzindo o conteúdo de GLUT2 e da glicoquinase em ilhotas pancreáticas (Soriano *et al.*, 2010). Além do mais, foi observada redução no fluxo de importantes lançadeiras envolvidas na cataplerose/anaplerose, como a lançadeira de glicerol-3-fosfato, em células beta pancreáticas (Sener *et al.*, 1996), possivelmente ocasionado por uma baixa atividade da enzima glicerolfosfato desidrogenase dependente de FAD (GPDH) (Rasschaert *et al.*, 1995). Em acordo com esses dados, nosso grupo de pesquisa mostrou que ilhotas isoladas de ratos submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram redução na oxidação da glicose (Filiputti *et al.*, 2010) o que pode ser outro fator contribuinte para redução da SIIG nesses animais.

Foi observado ainda, menor expressão da malato desidrogenase, enzima que participa da lançadeira piruvato-malato, e também da ATP-sintase (Theys *et al.*, 2009). A hipótese de reduzida capacidade anaplerótica das células beta pancreáticas em situação de desnutrição proteica é suportada também por evidências indiretas que relacionam a regulação da síntese de insulina à cataplerose do succinato e/ou succinil-CoA (Alarcon *et al.*, 2002; Attali *et al.*, 2006).

Outra alteração importante no metabolismo mitocondrial relacionado à secreção de insulina observada em animais desnutridos é a redução do malonil-CoA (De Barros Reis *et al.*, 2008). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou redução no conteúdo e função da glutamato desidrogenase (GDH) (Da Silva *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2012).

Portanto, os dados disponíveis sugerem que a desnutrição protéica reduz a produção dos MCFs, alterando mecanismos que estão diretamente relacionados ao processo de secreção de insulina. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis por tais alterações ainda é desconhecido.

Assim como o quadro de restrição protéica, o desbalanço no metabolismo energético relacionado ao acúmulo de gordura apresenta relação com alterações na modulação da SIIG. Alterações no acoplamento entre a glicólise e o metabolismo mitocondrial de células beta-pancreáticas vêm sendo apontadas como um dos fatores relacionados ao desenvolvimento do DM2. Neste sentido, diversos modelos experimentais de obesidade e diabetes mostram alterações no metabolismo da glicose nas células beta, tais como redução do conteúdo do GLUT2, redução na expressão da glicoquinase (baixa afinidade pela glicose) e subsequente aumento na expressão da hexoquinase (alta afinidade para glicose). Além do mais, acredita-se que o aumento na expressão da LDH, aliada a redução da gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase, sejam dois dos fatores responsáveis pela perda do acoplamento entre as duas vias metabólicas, que tem como resultado um aumento na oxidação do piruvato a lactato no citosol (Macdonald *et al.*, 1996; Jonas *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2008), diminuindo assim a oferta de substrato para as lançadeiras dependentes de piruvato e suas subseqüentes reações. Em adição, o desacoplamento influenciado pela redução das vias anapleróticas foi demonstrada pela menor expressão de várias enzimas que modulam as lançadeiras dependentes de piruvato, prejudicando a síntese dos MCFs e conseqüentemente a secreção de insulina em diabéticos obesos (Maechler *et al.*, 2006; Macdonald *et al.*, 2009). Diferentes modelos de obesidade e diabetes mostraram alterações nos níveis de diferentes metabólitos relacionados à modulação da SIIG e associado a isso alterações na expressão da PYC

(Yoshikawa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Fransson *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008) e na produção de NADPH (Xu *et al.*, 2008).

#### **1.4 Metabolismo mitocondrial e resistência periférica à insulina**

O aumento na concentração plasmática de insulina induz uma série de alterações no metabolismo das células musculares (Whiteman *et al.*, 2002; Youngren, 2007).

O mecanismo da resistência à insulina (RI) associa-se a disfunção de diversos componentes da cascata de sinalização deste hormônio. O receptor de insulina (IR) possui atividade tirosina quinase, a qual possibilita a fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRS) 1 e 2 após a ligação da insulina a subunidade alfa de seu receptor. Os IRS desempenham papel fundamental para a sinalização da insulina (Kasuga, Karlsson, *et al.*, 1982; Kasuga, Zick, *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 1991; Araki *et al.*, 1994; White, 2002), pois, iniciam uma cascata de sinalização envolvendo diferentes tipos de mediadores. A ativação dos componentes da via de sinalização da insulina induzirá a translocação dos transportadores de glicose responsivos ao hormônio (GLUT4) para a membrana das células musculares facilitando a captação do carboidrato (Katagiri *et al.*, 1996; Tanti *et al.*, 1996; Frevert and Kahn, 1997). A resistência muscular a insulina caracteriza-se pela reduzida capacidade em captar glicose sob a ação deste hormônio (DeFronzo *et al.*, 1981), a qual está associada à disfunção do IR e outros componentes de sua cascata de sinalização (Chang *et al.*, 1995; Goodyear *et al.*, 1995; Bjornholm *et al.*, 1997; Cusi *et al.*, 2000), tal como observado em sujeitos obesos (Goodyear *et al.*, 1995) e com DM2 (Bjornholm *et al.*, 1997), os quais apresentam baixos níveis de fosforilação do IRS-1.

Anormalidades na via de sinalização de insulina foram observadas em estados de desnutrição e obesidade. O déficit na sinalização do hormônio ocorre em associação com o excesso de acúmulo intracelular de lipídios, indicando uma correlação direta entre as duas condições (Savage *et al.*, 2007). Essa relação é observada em quadros de resistência à insulina, como obesidade, DM2 e lipodistrofias (Savage *et al.*, 2007). Reforçando esses achados, a infusão de lipídios por várias horas é capaz de induzir agudamente resistência à insulina (Yu *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas duas grandes teorias apontam mecanismos metabólicos diferentes para a instalação da resistência muscular a insulina. A primeira sugere que a resistência muscular a insulina se instala devido à redução na capacidade mitocondrial em captar e oxidar espécies lipídicas provenientes da dieta (Ruderman *et al.*, 1999; Morino *et al.*, 2006). Em humanos, a incapacidade da insulina em induzir a captação de glicose foi associada com uma função mitocondrial prejudicada (Stump *et al.*, 2003; Petersen *et al.*,

2004; Asmann *et al.*, 2006), incluindo redução no tamanho e número desta organela (Kelley *et al.*, 2002). O modelo proposto para a instalação da resistência à insulina baseia-se na proposta de que o fluxo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) provenientes da circulação ou mesmo de estoques intramusculares de lipídios (LIM) é desviado da Carnitina Palmitoiltransferase-1 (CPT1). A CPT1 é a enzima que catalisa o passo indispensável e limitante para a oxidação de ácidos graxos (beta-oxidação), uma vez que possibilita o transporte dessas moléculas para o interior da mitocôndria, levando ao acúmulo dessas moléculas no citosol, favorecendo assim a instalação da resistência à insulina (Yu *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2007).

As análises da geração dessas moléculas associadas à lipotoxicidade intramuscular embasam a ideia de que a redução na capacidade mitocondrial seja responsável pela instalação da resistência muscular à insulina. Associado a isso, estudos buscam encontrar marcadores moleculares que possam fornecer informações sobre o estado metabólico muscular e sua associação com a resistência à insulina. Nesse sentido, componentes do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Lebon *et al.*, 2001; Befroy *et al.*, 2007) e componentes associados à biogênese mitocondrial, tais como PGC-1 $\alpha$  e Tfam, podem ser analisados a fim de se caracterizar os mecanismos que delineiam esse processo (Larsson *et al.*, 1998; Puigserver *et al.*, 1998).

Entretanto, outros achados têm dado suporte a uma nova linha de raciocínio. Um estudo com ratos Zucker diabéticos, magros e obesos, mostrou que apesar do maior acúmulo de LIM em ratos obesos, a função mitocondrial foi comparável aos níveis observados em animais magros e, além disso, os animais obesos mostraram um aumento na taxa de oxidação de ácidos graxos de cadeia longa em detrimento de redução deste processo (De Feyter *et al.*, 2008). Em modelos animais com disfunção mitocondrial, tais como, o knockout para LC-CoA desidrogenase, o knockout músculo específico para PGC-1 $\alpha$  e camundongos com prejuízo na cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial não apresentaram resistência à insulina (Handschin *et al.*, 2007; Pospisilik *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Além desses, outros trabalhos tem mostrando que manipulações genéticas que aumentem o acúmulo intracelular de lipídios não necessariamente resultam em resistência a insulina (An *et al.*, 2004; Monetti *et al.*, 2007). Choi e colaboradores (2008) mostraram que a superexpressão músculo-específica de PGC-1 $\alpha$  agravou o quadro de resistência muscular à insulina quando camundongos foram alimentados com dieta rica em gordura (Choi *et al.*, 2008), além de aumentar o acúmulo de lipídios intramuscular (Summermatter *et al.*, 2010).

Esses achados estão de acordo com evidências de que o excessivo suprimento de lipídios para a mitocôndria, associado a um aumento na taxa de oxidação de lipídios resulta em um déficit na capacidade de oxidar as moléculas de ácidos graxos de forma completa, o que é motivado por um TCA que funciona de maneira insuficiente. Esse conceito de beta-oxidação incompleta ganhou força diante da observação dos níveis aumentados de acilcarnitinas de cadeia longa (ACCL) em pacientes diabéticos tipo 2 (Muio and Koves, 2007; Adams *et al.*, 2009; Mihalik *et al.*, 2010).

### 1.5 A Taurina

A taurina (TAU), ou ácido 2-aminoetanossulfônico, é um aminoácido que contém enxofre e está presente em altas concentrações em neonatos, principalmente no cérebro. Estudos epidemiológicos mostraram que pacientes diabéticos apresentam reduzidos níveis circulantes de TAU, sugerindo deficiência de ingestão ou de síntese deste aminoácido (Franconi *et al.*, 1995; De Luca *et al.*, 2001).

O transporte de TAU para o interior dos diferentes tipos celulares se dá por meio de dois tipos de transportadores o Tau-T e PAT1, sendo o primeiro o responsável por quase toda a quantidade deste aminoácido que é enviada ao meio intracelular (Jacobsen and Smith, 1968). Tau-T é um transportador de baixa capacidade e altíssima afinidade para TAU cuja regulação aguda se dá por: a- inibição através de acidificação do meio, inchaço osmótico celular, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e via ativação da proteína quinase C (PKC) (Hoffmann and Lambert, 1983; Lambert and Hoffmann, 1993; Voss *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2012); b- ou ativação, através da atividade da proteína quinase A dependente de cAMP (PKA) (Mollerup and Lambert, 1996; 1998). A redução em longo prazo da expressão deste transportador pode ser induzida pela ativação da proteína supressora de tumor p53, TAU ou por hipotonicidade (Voss *et al.*, 2004). Por outro lado, foi sugerido que a hipertonicidade, através da ativação da mTOR (Lambert *et al.*, 2014), que por sua vez levaria aumento na resposta de elementos responsivos a tonicidade ativando vias que resultam no aumento da expressão do Tau-T. Além destes, outros fatores foram propostos como contribuidores para o aumento no transporte de TAU por aumentar a expressão gênica de Tau-T, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) (Bridges *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2002), fatores que apresentam seus níveis alterados em quadros como desnutrição e síndrome metabólica.

Estudos mostram que a administração desse aminoácido durante o desenvolvimento de camundongos causa aumento no número e no tamanho das ilhotas sem

afetar a porção exócrina do órgão (El Idrissi *et al.*, 2009). Além do mais, TAU parece ter um efeito protetor contra apoptose induzida por streptozotocina (Lin *et al.*, 2013).

Nosso laboratório tem demonstrado que o tratamento com TAU, *in vivo* (2,5% na água de beber) e *in vitro*, em ilhotas de Langerhans aumenta a sensibilidade das células beta à glicose, e promove maior localização do fator de transcrição de ilhotas de Langerhans (PDX-1) em núcleos destas células (Carneiro *et al.*, 2009). O tratamento *in vivo* com TAU também aumenta a tolerância à glicose e insulina além de aumentar a captação de cálcio e expressão da subunidade  $\beta 2$  do canal de cálcio voltagem-dependente em ilhotas de Langerhans (Ribeiro *et al.*, 2009).

Reusens e colaboradores verificaram, através de análise de microarray, diferenciação na expressão de alguns genes, envolvidos principalmente no ciclo celular, em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à desnutrição protéica. Entretanto a suplementação com 2.5% de TAU na água de beber foi eficaz em restabelecer essas alterações (Reusens *et al.*, 2008) mostrando efeitos da TAU sobre a homeostase glicêmica desses animais.

A TAU regula a homeostase glicemia/energética, atuando nos tecidos periféricos e regulando expressões de peptídios hipotalâmicos. Recentemente um estudo com miotubos L6 mostrou que TAU aumenta a captação de glicose e esse efeito está relacionado com a ativação de uma importante enzima do metabolismo energético, comumente relacionada à instalação da resistência periférica a insulina, a AMPK, do inglês, AMP-activated protein kinase (Cheong and Chang, 2013). Além do mais, a TAU é capaz de melhorar hiperglicemia e dislipidemia em modelo de obesidade e diabetes em roedores por reduzir a resistência periférica à insulina (Kim *et al.*, 2012). Entretanto em nossos trabalhos observamos que os efeitos da TAU desaparecem em animais desnutridos que foram em seguida, alimentados com HFD. Os mecanismos pelos quais esse aminoácido perde sua eficácia nessa situação ainda não foram esclarecidos.

## **2) OBJETIVOS**

### **2.1) Gerais**

#### **2.1.1. Estudo em Ilhotas Pancreáticas**

Primariamente, investigamos se as alterações observadas na SIIG em nossos modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, previamente desnutridos ou não, estão relacionadas com mudanças na função da Piruvato Carboxilase, enzima ligada à produção de fatores de acoplamento metabólicos, e a taxa de biogênese mitocondrial. Secundariamente, investigamos se a ausência de efeitos da TAU em animais desnutridos e alimentados com dieta rica em gordura tem relação com o transporte de TAU em ilhotas pancreáticas.

#### **2.1.2. Estudo em Músculo Esquelético**

Nesta parte do estudo, investigamos se as características descritas pela hipótese do fenótipo econômico favoreceriam a instalação da resistência muscular a insulina devido a disfunções metabólicas em camundongos submetidos à restrição proteica após o desmame e em seguida, alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, investigamos se a suplementação com TAU seria capaz de prevenir tais alterações.

### **2.2) Estratégias experimentais**

#### **2.2.1. Estudo em Ilhotas Pancreáticas**

- Avaliar o perfil secretório de insulina, bem como as variações nas flutuações de NADPH, em ilhotas pancreáticas isoladas e estimuladas com altas concentrações de glicose em nosso modelo experimental;
- Avaliar a participação da piruvato carboxilase, bem como a produção de NADPH, na modulação da secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas e estimuladas por altas concentrações de glicose;
- Avaliar o perfil de expressão proteica de enzimas envolvidas no metabolismo glicolítico e mitocondrial acoplado ao mecanismo de secreção de insulina, tais como glicoquinase, piruvato carboxilase, PGC-1 $\alpha$  e Tfam;
- Avaliar a expressão proteica do transportador de taurina, bem como os níveis de taurina em ilhotas pancreáticas, a fim de investigar se a ausência de efeitos deste aminoácido em animais desnutridos é devido a alterações no transporte de taurina em tecido muscular esquelético;

#### **2.2.2. Estudo em Músculo Esquelético**

- Avaliar a taxa de fosforilação da AKT bem como o acúmulo de triacilgliceróis em músculo gastrocnêmio em nosso modelo experimental;
- Avaliar o perfil de expressão proteica de enzimas do metabolismo glicolítico e mitocondrial, associadas à sensibilidade à insulina, tais como fosfofrutoquinase-1, lactato desidrogenase, piruvato desidrogenase, piruvato carboxilase e ATP-citrato liase em nosso modelo experimental;
- Avaliar a produção de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, tais como  $\alpha$ -cetoglutarato, oxalacetato e malato, em nosso modelo experimental;
- Avaliar a taxa de fosforilação de enzimas associadas a modulação da flexibilidade metabólica, tais como AMPK, ACC, PGC-1 $\alpha$  e Tfam;
- Avaliar o coeficiente respiratório, a fim de caracterizar a fonte de nutrientes preferencialmente oxidados em nosso modelo experimental;



### 3) ARTIGO 1

## **Protein Malnutrition Impairs Taurine Reestablishment of Glucose-Stimulated Insulin Secretion Induced by a High-fat Diet due to the Lack of Increment in the Expression of Taurine-Transporter Protein**

**Renato Chaves Souto Branco<sup>1</sup>, Thiago Martins Batista<sup>1</sup>, Rafael Ludemann Camargo<sup>1</sup>, Jean Franciesco Vettorazzi<sup>1</sup>, Patrícia Cristine Borck<sup>1</sup>, Junia Carolina Rebelo dos Santos-Silva<sup>1</sup>, Cláudio Cesar Zoppi<sup>1</sup>, Antonio Carlos Boschero<sup>1</sup>, Everardo Magalhães Carneiro<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

***Abbreviated title:*** Malnutrition Blunts Taurine Effect on Insulin Secretion.

***Word count:*** 6782

***Number of figures and tables:*** 6

***Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:***

Dr. Everardo Magalhães Carneiro  
Department of Structural and Functional Biology  
Institute of Biology  
University of Campinas (UNICAMP)  
13083-970 Campinas, SP, Brazil  
phone: +55 (19) 974120778  
e-mail: [claudiozoppi@hotmail.com](mailto:claudiozoppi@hotmail.com)

**Disclosure statement:** The authors have nothing to disclose.

***Nonstandard Abbreviations List***

HFD – High-fat Diet

IL-6 – Interleukin-6

MCF – Metabolic Coupling Factors

mTOR - Mechanistic Target of Rapamycin

NO – Nitric Oxide

Ob – Leptin-deficient Obese Mice

PAA – Phenylacetic Acid

PGC-1 $\alpha$  - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-  
alpha

PKA – Protein Kinase A

PKC – Protein Kinase C

PYC – Pyruvate Carboxylase

TAU – Taurine

Tau-T – Taurine Transporter

TCA – Tricarboxylic Acid Cycle

Tfam – Mitochondrial Transcriptor Factor A

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor-alpha

### **Abstract**

Taurine (TAU) restores beta cell function in obesity; however, its action is lost in protein malnourished rodents fed a high-fat diet. Here, we investigated the mechanisms involved in the lack of effects of TAU in this model. Thirty days-old C57BL/6 mice were fed a control (14% protein-C) or a protein-restricted (6% protein-R) diet for 6 weeks. Afterward, mice received a high-fat diet (HFD) for 8 weeks (CH and RH) with or without 5% TAU supplementation after weaning on their drinking water (CHT and RHT). HFD increased insulin secretion through mitochondrial metabolism in CH and RH. TAU prevented all those alterations in CHT only. The expression of the Taurine transporter (Tau-T), as well as TAU content in pancreatic islets, was increased in CH, with no effects on RH. Protein malnutrition programs beta cells dysfunction and impairs TAU-induced restoration of mitochondrial metabolism and biogenesis. This may be associated with modulation of the expression of Tau-T in pancreatic islets, which may be responsible for the absence of effect of TAU in protein-malnourished obese mice.

**Key terms:** Protein restriction, Obesity, Taurine supplementation, Pyruvate Carboxylase

## Introduction

Mitochondrial metabolism plays a key role in pancreatic beta cell ( $\beta$  cells) signaling by adjusting insulin stimulus/secretion coupling through the production of metabolic coupling factors (MCFs) according to the demand of nutrients (1). Although several metabolic pathways may participate in the generation of the MCFs (2-5), consistent evidence shows pyruvate carboxylase (PYC) as a major mitochondrial enzyme involved in this process (6, 7, 8). PYC participates in the pyruvate-citrate cycle by acting on the amplification of insulin secretion as an anaplerotic enzyme; it increases oxaloacetate production, tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates and several MCFs, such as NADPH, malonyl-CoA, GTP, and long-chain acyl-CoA production (9). Protein malnutrition during the perinatal period of life is associated with increased risk of obesity, insulin resistance, and development of type 2 diabetes later in life. According to the thrifty phenotype hypothesis, reduced availability of nutrients during developmental stages favors metabolic programming that may disrupt glycemic control after increased nutrient intake (10). Consistent with this evidence, mitochondria dysfunction has been associated with early malnutrition-induced metabolic programming (11). Mitochondrial dysfunction of  $\beta$  cells was already reported in the adult offspring of malnourished dams, showing reduced insulin secretion associated with lower ATP production and gene expression of various mitochondrial pathways (12). Hence, reduced content of glutamate dehydrogenase (GDH) protein in pancreatic islets was also associated with altered insulin secretion in protein-malnourished rats (13); however, malnutrition programming of other mitochondrial shuttles, such as the pyruvate/citrate cycle, have not been investigated yet.

Taurine (TAU), a non-essential amino acid found at high concentration in mammalian tissues, exerts several actions within the cells, including antioxidant activity and mitochondrial metabolism (14, 15). Taurine accumulates in the cells mainly through Taurine Transporter (Tau-T) (16). Tau-T activity is regulated in a short-term and/or a long-term manner. Short-term activity may occur due to milieu acidification, osmotic pressure, increased production of reactive oxygen species (ROS), and activation of protein kinase C (PKC); all may lead to the inhibition of Tau-T (17-20). In contrast, its activity increases via protein kinase A (PKA) action (21, 22). Long-term activity includes hypertonicity that may increase the expression of Tau-T through the activation of mTOR (mechanistic target for rapamycin) (23). In addition,

the increased transport of TAU was also linked to the augmentation of the expression of Tau-T, controlled by other factors such as tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and nitric oxide (NO) (24-26). TAU supplementation restores  $\beta$  cell function and morphology in obesity and malnutrition (27, 28). We also reported that when mice were fed low-protein chow followed by a high-fat diet (HFD), the effects of TAU on insulin secretion or peripheral insulin sensitivity were blunted (29, 30).

Considering the role of mitochondria on the coupling of the stimulus/secretion of insulin and taking them as the intracellular site of metabolic programming for the development of obesity and T2D, we thought that early protein malnutrition followed by a high-fat diet might exacerbate mitochondrial dysfunction. In addition, it is possible that the lack of effects of TAU in protein-malnourished mice might be associated with alterations in the expression of Tau-T. Here, we have assessed the functional and molecular mechanisms involved with changes in mitochondrial metabolism, focusing on the participation of PYC as well as NADPH production in pancreatic islets cells of malnourished obese mice, as well as the possible effects of the amino acid TAU upon these parameters. Moreover, we investigated the expression of Tau-T in isolated pancreatic islets. These findings might contribute to identifying possible mechanisms by which early-life malnutrition increases obesity and T2DM susceptibility and determine if TAU could participate in this modulation.

## **Materials and methods**

### **Reagents and Diet Composition**

Phenylacetic acid was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and <sup>125</sup>I-labeled insulin from Genesis (São Paulo, SP, Brazil). Western Blot reagents were purchased from Bio-Rad and antibodies from Cell Signaling and Santa-Cruz Biotechnologies. All other reagents were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), unless stated in the text. For diet details, see (31).

### **C57/BL6 Mice**

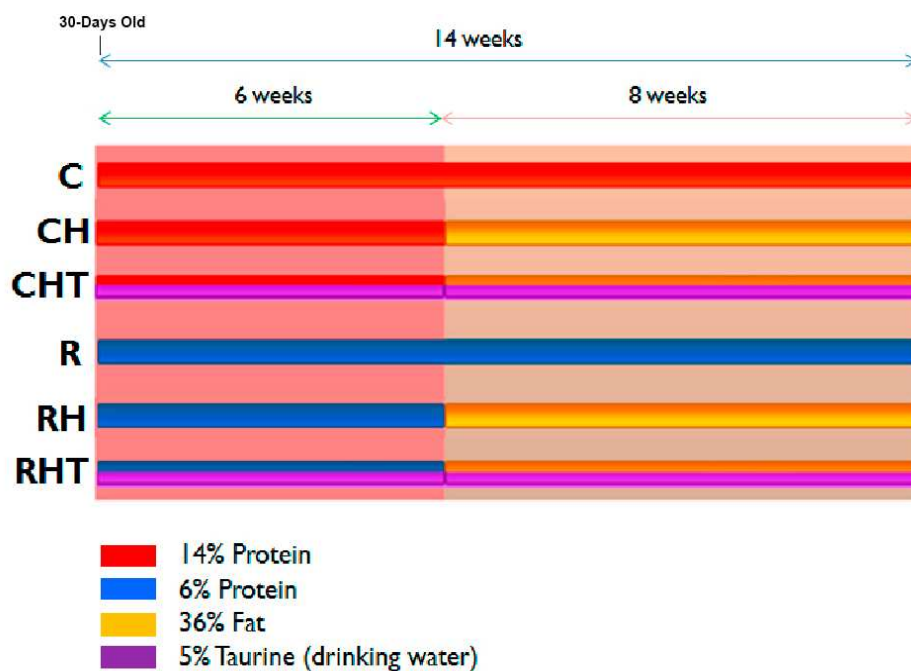
The Animal Care Committee at UNICAMP approved all the experiments involving animals (protocol number: 2827-1). Male 30-day-old C57BL/6 mice were obtained from the breeding colony at UNICAMP and were maintained at 22  $\pm$  1 °C, on a 12-h light–dark cycle, with free access to food and water. As represented on the following scheme 1, mice were randomly grouped as follows: mice fed a regular-protein diet (14% protein) (Control group: C, *n*=45) or mice fed a 6% protein diet

(Restricted group: R,  $n = 45$ ). After 6 weeks, C and R groups were subdivided and received or not a HFD (35% fat) for the following 8 weeks (CH and RH). Half of the mice fed a HFD received 5% of TAU in their drinking water from the weaning until the end of the experiment; the groups were named CHT and RHT.

### Ob-Ob Mice

Male 30-day-old obese leptin-deficient mice (Ob-Ob) were kept at the same conditions and fed a regular chow diet for 14 weeks without (Ob) or with 5% TAU (ObT) in the drinking water. Mice (18 weeks-old) were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber and decapitated for pancreatic islet isolation by collagenase digestion of the pancreas, as previously described (32).

### Scheme 1



### Nutritional Status Assessment

After overnight fasting, retroperitoneal cushions, and epididymal adipose tissue were removed and weighed. Blood was collected in tubes containing an anticoagulant. Plasma was separated by centrifugation at 1200xg for 15 minutes, and part was stored at -20°C for later determination of insulin (by radioimmunoassay), glucose (glucose analyser - Accu Check Advantage - Roche Diagnostic, Switzerland), and interleukin-6 (IL-6) concentrations (the latter was measured using the Milliplex KIT from Millipore, Billerica – USA, following manufacturer instructions).

### **Insulin secretion**

For static insulin secretion, pancreatic islets (groups of 4 islets per well) were incubated for 45 minutes with Krebs-Bicarbonate buffer (KBB) with the following composition (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 NaHCO<sub>3</sub>, 15 HEPES, supplemented with 5.6 glucose, 0.3% BSA, and equilibrated with a mixture of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> to give a pH of 7.4. After a 45-minute pre-incubation period, the medium was removed and immediately replaced with fresh KBB medium containing different glucose concentrations and with or without 5 mM of the PYC inhibitor phenylacetic acid (PAA). After 1 hour of incubation, the medium was removed, and the insulin concentrations were measured. Part of the incubated islets was then harvested for measurement of the total insulin content (TIC). For that, after 1 hour of incubation, the supernatant was removed, and then 1 mL of deionized pure water was added to each sample, and the samples were sonicated twice for 15 seconds each time. Insulin concentration, from all samples was measured by a radioimmunoassay (RIA) method using <sup>125</sup>I-labeled insulin as a tracer.

### **Total DNA Content**

Groups of 20 islets were used for the measurement of the DNA content. The DNA was extracted by the Trizol/Triton method (Santos et al., 2011). The samples were measured using a DNA standard curve (Sybr-green fluorescence detection).

### **NAD(P)H fluorescence**

Isolated islets were washed with Krebs solution containing 5.6 mM glucose and 3% bovine serum albumin (BSA) and then were maintained for 1 h in aerated oven with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> at 37° C. Subsequently, islets were transferred to glass slides pretreated with poly-lysine in a chamber that was thermostatically regulated at 37°C on the stage of an inverted microscope (Nikon, UK) and perfused in the presence of different stimuli. The generation of NADPH fluorescence was recorded with an ORCA-100 CCD camera (Hamamatsu Photonics Iberica, Barcelona, Spain) in conjunction with a Lambda-10-CS dual filter wheel (Sutter Instrument Company, CA, USA), with an image acquired every 60 seconds. Islets were initially kept under infusion for 5 minutes in Krebs containing 2.8 mM glucose. After this period, the perfusate was replaced by another containing 22 mM glucose that was infused over 10 minutes. Then, medium was added to 5 mM of phenylacetic acid and recorded for 10 minutes. Finally, the islets were subjected to a perfusion solution

containing 2.8 mM glucose for 5 minutes. Auto fluorescence of NAD(P)H was obtained with excitation at 365 nm and emission at  $445\pm 25$  nm, with an image obtained every 3 seconds (33). As the fluorescence of NAD(P)H increases with the number of cells, the results were normalized for each islet according to the fluorescence of that obtained at 2.8 mM glucose.

### **Measurement of Taurine Content in Pancreatic Islets**

The TAU content in pancreatic islets was measured after extraction of the total amino acid content with 80% ethanol containing 0.1 M HCl. The mixture was sonicated for 10 min and further homogenized for 1 h, followed by centrifugation at  $10\,600\times g$  for 15 min. The supernatant was filtered through a Vivaspinn 300 spin column membrane; 40  $\mu$ L of each sample was derivatized with phenylisothiocyanate [waters pico-tag for free amino acids (WAT0 10954 Ver4)], and 20  $\mu$ L of the phenylisothiocyanate derivatives was separated by chromatography using a Luna C-18 5  $\mu$ , 250 $\times$ 4.6 mm column (00G-4252-EQ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 50°C in an HPLC system (SCL-10avp, CTO10avp, SPDm10avp; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) with CLASS-VP 6.12 software. Solvent A was ACN 60% and solvent B was sodium acetate 0.58 M + 5% of ACN. An amino acid standard solution was derivatized and analyzed together with the samples, and methionine sulfone was used as an internal control.

### **Western blot analysis**

Western blot experiments were performed as previously described (34). The lysate was placed in a 1.5 ml tube and mixed with lyses/anti-protease buffer containing 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 100 mmol/L Tris pH 7.5, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L PMSF, and 1% Triton-X 100. The islets were sonicated twice on 15-second pulses. The extracts were then centrifuged at  $12,600\times g$  at 4 °C for 5 min to remove insoluble materials. The protein concentration in the supernatants was assayed using the Bradford dye method (Bradford, 1976), with BSA as a standard curve and the Bradford reagent (Bio-Agency Lab., São Paulo, SP, BRA). Protein samples were separated on SDS-PAGE 8-10%, transferred to a nitrocellulose membrane, and incubated with specific antibodies (Glucokinase - Sc-7908; Pyruvate Carboxylase - Sc-49229; PGC-1 $\alpha$  - #42595 Cell Signaling; Tfam - Sc-376672; GAPDH - Sc-25778; Taurine Transporter (Tau-T); phosphor- and total-STAT3 – Sc-7993 (Tyr705); Sc-482; phospho- and total-AKT – Sc-135650 (Ser473); Sc-33437;



Sc-8312; phospho- and total-AMPK $\alpha$  #2535; #2532; Cell Signaling; alpha-tubulin #3873; Cell Signaling) that were diluted 1: 1000, and subsequently detected by exposure to chemiluminescent substance (luminol and peroxidase), followed by detection in a GE Photoanalyzer. The quantification of the bands was performed by densitometry, using ImageJ software.

### **Statistical analysis**

Results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The data were submitted to the Student t test or analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-test between the two large groups, controls and protein-malnourished mice, by GraphPad PRISM ® version 5.0 software, using as confidence interval 95%.

### **Results**

#### **Taurine prevented weight gain, fat accumulation, hyperglycemia and hyperinsulinemia in control mice fed a HFD**

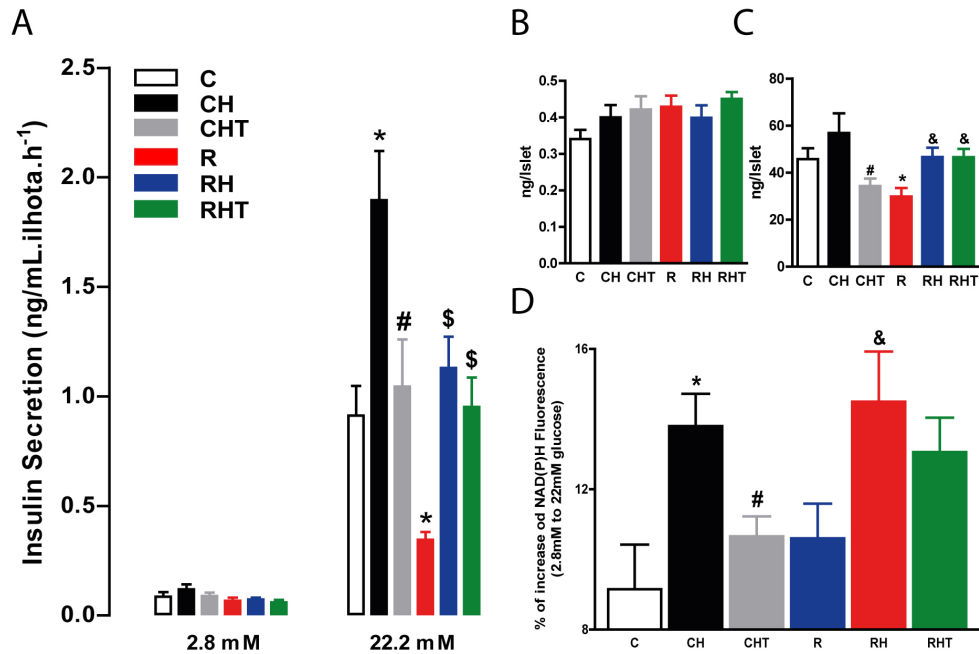
Mice from group R displayed reduced body weight compared with those from group C ( $p < 0.05$ ; Table 1). Mice fed an HFD (both the CH and RH groups) gained more weight and displayed increased epididymal and retroperitoneal fat accumulation, when compared to C and R, respectively ( $p < 0.05$ ; Table 1). Tau supplementation prevented weight gain and fat accumulation only in CHT mice. ( $p < 0.05$ , Table 1). CH mice became hyperglycemic and hyperinsulinemic during fasting when compared with C mice ( $p < 0.05$ , Table 1). Tau supplementation partially prevented this increment on glycemia and insulinemia only in CHT mice ( $p < 0.05$ , Table 1).

#### **Taurine prevented increased glucose-stimulated insulin secretion as well as NADPH fluorescence levels in control mice fed a HFD**

As observed in figure 1A, protein-malnutrition reduced by 60% the GSIS at 22 mM glucose in R islets ( $p < 0.05$ , compared to C). A HFD increased insulin secretion in both CH (106% increased) and RH (227% increased) groups when compared with C and R, respectively ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). Tau treatment prevented HFD-induced increment on GSIS in CHT mice, as judged by the reduction of 45% on secreted insulin compared with CH ( $p < 0.05$ ). Interestingly, no effects of TAU were observed on RHT islets at this condition. Figure 1D shows that the increment on NAD(P)H fluorescence at high glucose concentrations was approximately 50% higher in CH compared with C ( $p < 0.05$ ) and RH when compared to R ( $p < 0.05$ ). This increment was prevented by TAU treatment in CHT (figure 2C). Moreover, the total

insulin content in CHT islets was lower than CH ( $p<0.05$ ), as well as in R islets compared with C ( $p<0.05$ ) (figure 1C). No differences were found in the total DNA content (figure 1B).

**Figure 1**



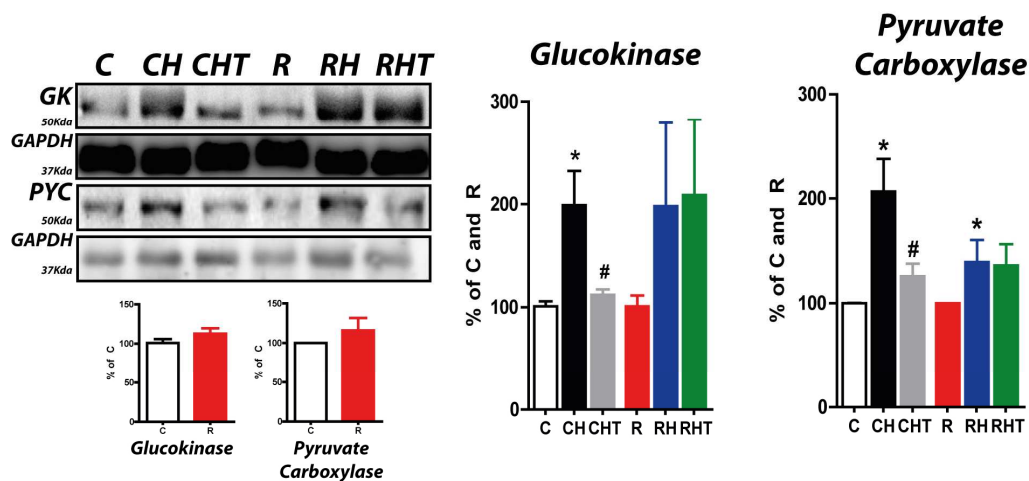
**Figure 1:** (A) Static insulin secretion from pancreatic islets isolated from control (C), control + high-fat diet (CH), and control + high-fat diet + Taurine (CHT), protein restriction (R), protein restriction + high-fat diet (RH) and protein restriction + high-fat diet + Taurine (RHT), and incubated with 2.8 mM or 22 mM of glucose; (B) Total DNA content, (C) Total insulin content of isolated pancreatic islets. (D) Increment of NAD(P)H fluorescence comparing the stimulation of 22 mM of glucose with 2.8 mM of glucose in perfused pancreatic islets. The bars represent the media  $\pm$  SEM,  $p<0.05$ . \*: significant differences compared to C,  $p<0.05$ ; #: significant differences compared to CH,  $p<0.05$ ; &: significant differences compared to R,  $p<0.05$  (One-way ANOVA plus Tukey's post-test or Student's t test).

#### **Taurine prevented increment in glucokinase and pyruvate carboxylase protein expression in control mice fed a HFD**

A HFD increased the expression of two important metabolic enzymes associated with modulation of GSIS in CH islets. Figure 2A shows that GK expression was increased 2-fold compared with C ( $p<0.05$ ). Tau treatment prevented this increment in CHT islets, in which GK expression was 40% lower compared with CH

( $p < 0.05$ ). A similar pattern was observed with the expression of PYC protein. A HFD induced a 2-fold increment in CH islets when compared with C ( $p < 0.05$ ). The expression of PYC in CHT islets was 42% lower, compared with CH (Figure 2B,  $p < 0.05$ ). PYC protein expression was 40% higher in RH mice compared with R ( $p < 0.05$ ); however, no effects of TAU were observed in RHT.

**Figure 2**



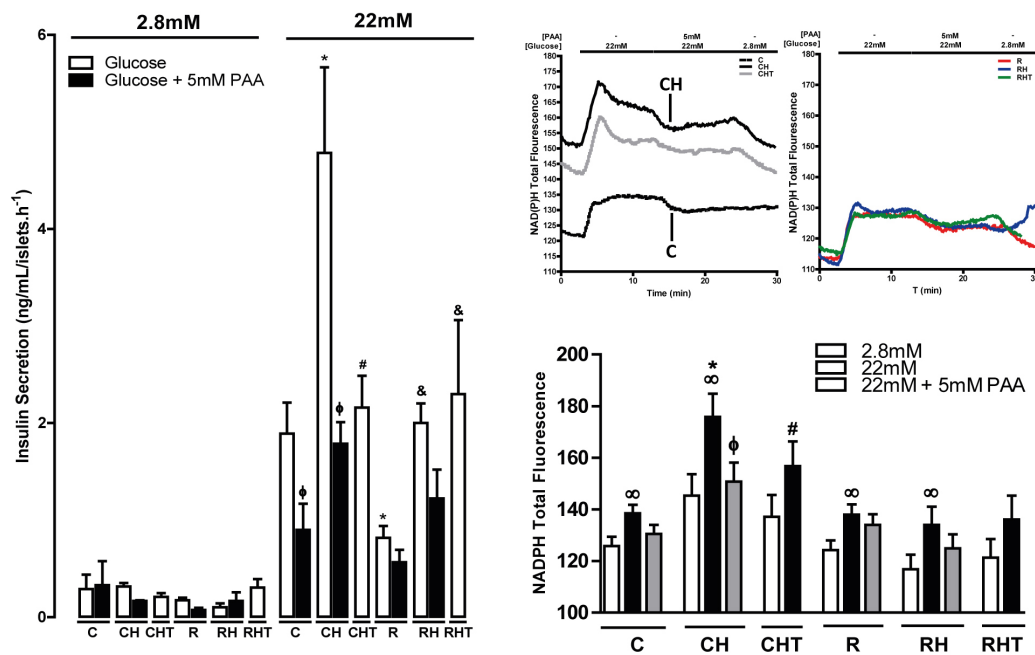
**Figure 2:** (A) Analysis of glucokinase, (B) pyruvate carboxylase protein content from isolated pancreatic islets. C: control; CH: control + high-fat diet; CHT: control + high-fat diet + Taurine; R: protein restriction; RH: protein restriction + high-fat diet; RHT: protein restriction + high-fat diet + Taurine. Comparison of (C) glucokinase, (D) pyruvate carboxylase between C and R groups. \*: significant differences compared to C,  $p < 0.05$ ; #: significant differences compared to CH,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA plus Tukey's post-test); &: significant differences compared to R,  $p < 0.05$ .

### **Inhibition of pyruvate carboxylase prevented increment on glucose-stimulated insulin secretion induced by HFD**

PAA were used to inhibit PYC to observe the involvement of PYC on the reduction of glucose-induced insulin secretion in malnourished and obese mice. In this experiment, the pattern of glucose-induced insulin secretion at 22.2 mM glucose was similar to figure 1A, as previously described. The inhibition of PYC by PAA was

reduced by 55% GSIS in isolated pancreatic islets of C group at 22 mM glucose (Figure 3A,  $p < 0.05$ ). The addition of PAA normalized GSIS in CH islets, reducing the amount of secreted insulin approximately 60%, reaching similar levels of insulin secretion found in C and CHT (figure 3A,  $p < 0.05$ ). Figure 3B shows the pattern of NADPH oscillations under stimulating glucose concentration in the absence or presence of PAA. Figure 3C shows the relative reduction of NAD(P)H fluorescence after PAA addition. The pattern of NADPH fluorescence at 22.2 mM glucose was similar to that observed in figure 2C. Interestingly, PAA inhibition of PYC led to a reduction of NAD(P)H fluorescence in CH islets compared to NAD(P)H fluorescence before the addition of PYC inhibitor. No differences were observed between the other groups.

**Figure 3**



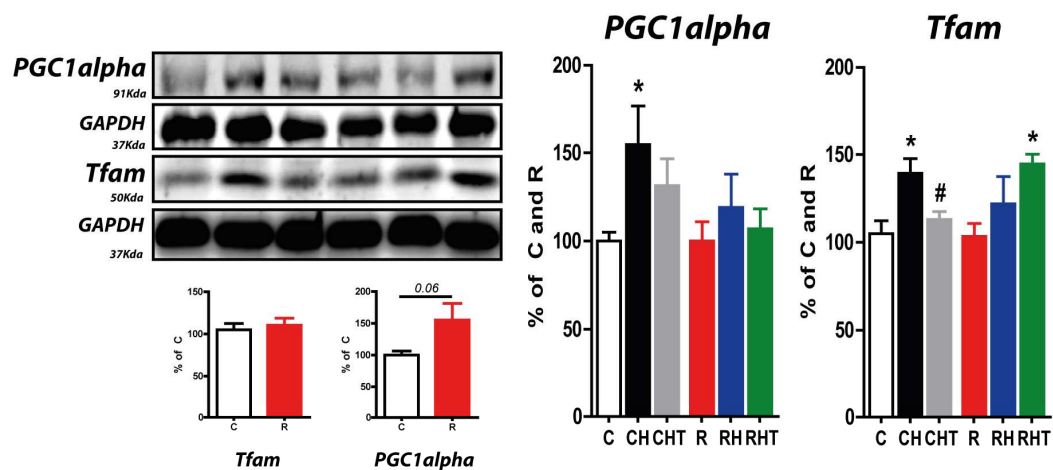
**Figure 3:** (A) Static insulin secretion from pancreatic islets isolated from control (C), control + high-fat diet (CH) and control + high-fat diet + Taurine (CHT), protein restriction (R), protein restriction + high-fat diet (RH) and protein restriction + high-fat diet + Taurine (RHT) and incubated with 2.8 mM or 22 mM of glucose (white bars) in presence or not of 5 mM of Pyruvate Carboxylase inhibitor phenylacetic acid (PAA) (black bars). (B) Total NAD(P)H Fluorescence – Representative Graphs. (C) Total NAD(P)H Fluorescence in Perfused Islets incubated in 2.8 mM (white bars), 22 mM (black bars) and 22 mM of glucose + 5 mM of PAA) (gray bars). C: control; CH:

control + high-fat diet; CHT: control + high-fat diet + Taurine; R: protein restriction; RH: protein restriction + high-fat diet; RHT: protein restriction + high-fat diet + Taurine. \*: significant differences compared to C,  $p < 0.05$ ; #: significant differences compared to CH,  $p < 0.05$ ; &: significant differences compared to R,  $p < 0.05$ ; ∞: significant differences compared to the incubation with 2.8 mM of glucose intragroup; Φ: significant differences compared to the incubation with 22 mM of glucose intragroup (one-way ANOVA plus Tukey's post-test or student t test).

### **Taurine prevented increment on PGC-1 $\alpha$ and Tfam protein expression in control mice fed a HFD**

In accordance with the previous results, no differences in the modulation of the expression of two mitochondrial metabolism and biogenesis markers, Tfam and PGC-1 $\alpha$ , in protein-malnourished mice were found (R, RH and RHT) (Figure 4). However, supporting our findings, a HFD increased the expression of the Tfam and PGC-1 $\alpha$  proteins in CH mice, compared with C (figure 4A and 4B,  $p < 0.05$ ). TAU treatment prevented an increase of the expression of Tfam in CHT mice compared with CH ( $p < 0.05$ ). No effects of TAU were observed in the expression of PGC-1 $\alpha$  on that group (figure 4A).

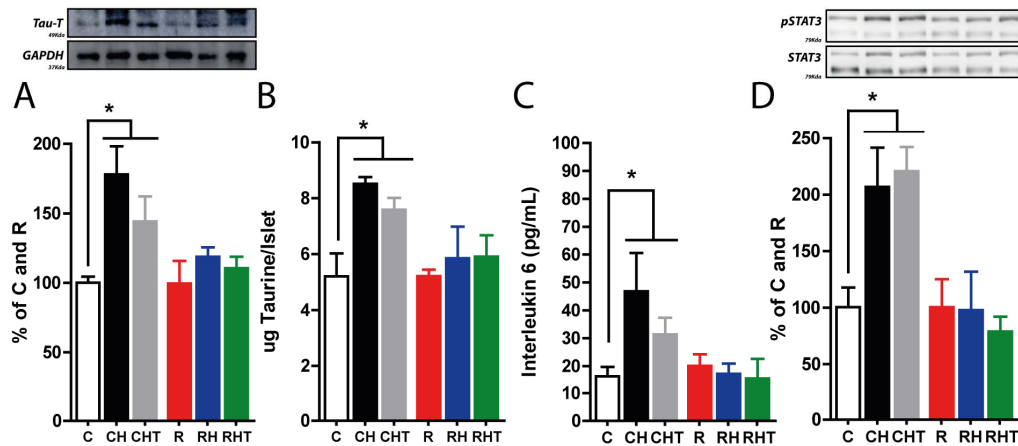
**Figure 4**



**Figure 4:** (A) Analysis of PGC1alpha, (B) Tfam protein content from isolated pancreatic islets. C: control; CH: control + high-fat diet; CHT: control + high-fat diet + Taurine; R: protein restriction; RH: protein restriction + high-fat diet; RHT: protein restriction + high-fat diet + Taurine. Comparison of (C) PGC1alpha, (D) Tfam between C and R groups. \*: significant differences compared to C,  $p < 0.05$ ; #: significant differences compared to CH,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA plus Tukey's post-test); &: significant differences compared to R,  $p < 0.05$ .

#### **HFD increased Taurine transporter protein expression, pancreatic islets' Taurine content and plasma interleukin-6 levels**

Due the intriguing lack of effects of Tau in protein-malnourished mice fed an HFD, we evaluated whether this observation would be associated with alterations on TAU transport into the pancreatic islet's cells. HFD increased the expression of Tau-T protein in CH, compared with control (Figure 4A,  $p < 0.05$ ). Tau supplementation had no significant effects upon this parameter in either supplemented group. Interestingly, RH mice did not display an increase in the expression of Tau-T protein. Supporting this finding, Tau content in pancreatic islets was 2-fold and 1.5-fold higher in CH and CHT groups, compared with C, respectively (Figure 4B,  $p < 0.05$ ). HFD increased plasma IL-6 levels in CH and CHT compared with the control (Figure 4C,  $p < 0.05$ ). This increment was absent in all protein-malnourished groups. STAT3 phosphorylation, a downstream step in the IL-6 pathway, was higher in the CH and CHT groups (Figure 4D,  $p < 0.05$ ), and as expected, no alterations were found in pancreatic islets from protein-malnourished mice.

**Figure 5**

**Figure 5:** Analysis of (A) the Taurine Transporter protein expression; (B) the Pancreatic Islet Taurine content, (C) the Interleukin-6 plasmatic levels, and (D) the STAT3 phosphorylation ratio (phosphoSTAT3/STAT3). C: control; CH: control + high-fat diet; CHT: control + high-fat diet + Taurine; R: protein restriction; RH: protein restriction + high-fat diet; RHT: protein restriction + high-fat diet + Taurine. \*: significant differences compared to C,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA plus Tukey's post-test or student t test).

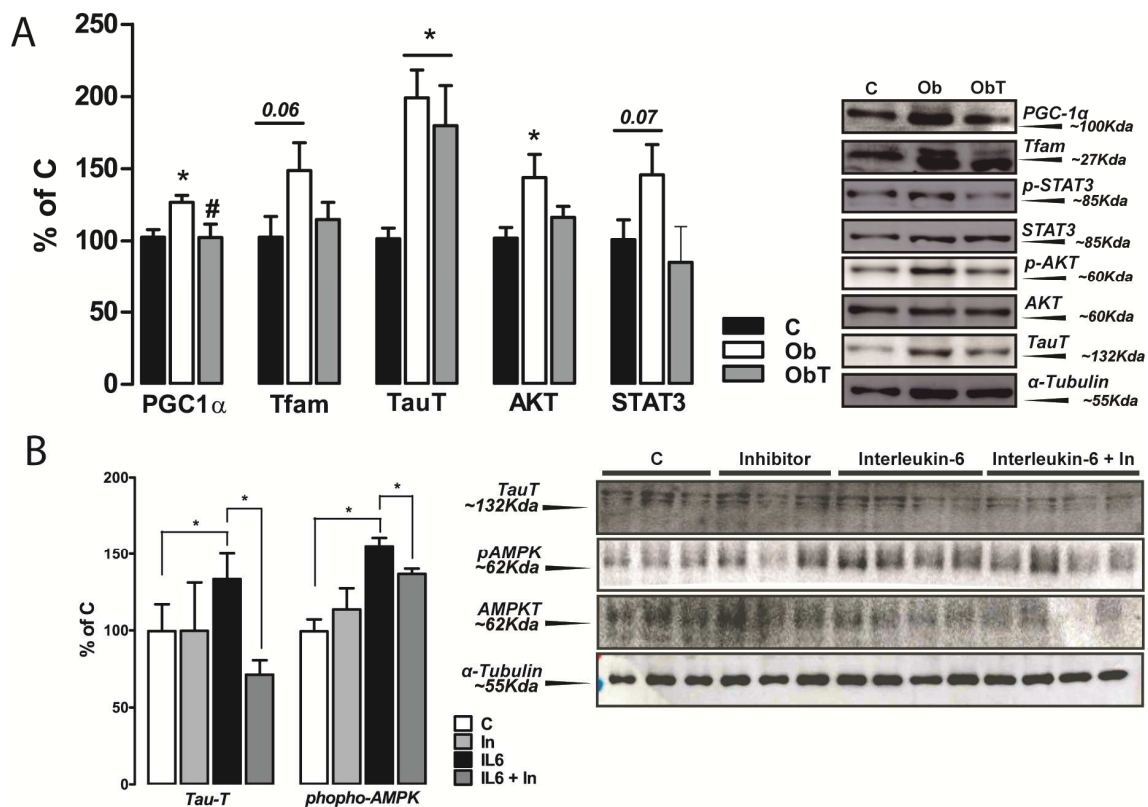
#### **Protein expression profile in pancreatic islets from leptin-deficient mice (Ob) supplemented or not with TAU**

To test whether this effect would be associated with leptin action, a hormone that also acts through the JAK-STAT pathway, we evaluated the expression profile of some proteins that participate in important metabolic pathways in isolated islets from Ob mice. These islets displayed increased PKB/AKT phosphorylation as well as PGC-1 $\alpha$ , Tfam, and most importantly, Tau-T expression ( $p < 0.05$ ) (figure 5A). Interestingly, TAU treatment prevented the increment of both mitochondrial markers, PGC-1 $\alpha$  and Tfam; however, no effects were observed in the levels of Tau-T protein.

## Interleukin-6 increases Taurine transporter protein expression in isolated pancreatic islets

Pancreatic islets, treated with IL-6 for 24 h, displayed increased expression of Tau-T protein as well as of the phosphorylation ratio of AMPK-alpha ( $p < 0.05$ ) (figure 5B). This effect was blunted in the presence of an IL-6 inhibitor, suggesting the participation of IL-6 on the expression of Tau-T.

**Figure 6**



**Figure 6:** Analysis of (A) PGC-1 $\alpha$ , Tfam, Tau-T, AKT (phosphoAKT/AKT) and STAT3 (phosphoSTAT3/STAT3) phosphorylation and protein expression of pancreatic islets isolated from Obese Leptin-deficient mice; (B) Tau-T and AMPK phosphorylation and protein expression of pancreatic islets incubated with 50 pg/mL of IL-6, in presence or not of IL-6 receptor inhibitor, for 24 h. C: control; Ob: Obese Leptin-deficient Mice; ObT: Ob mice + Taurine; \*: significant differences compared to C; #: significant differences compared to Ob,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA plus Tukey's post-test or Student's t test).

## Discussion

Since the thrifty phenotype hypothesis was proposed (35), epidemiological, clinical and experimental evidence have been accumulated that support the notion that impaired fetal and infant growth predisposes an individual to



obesity and development of T2DM (36). In malnourished rodents, mitochondrial dysfunction in tissues directly involved with blood glucose control, such as liver and skeletal muscle, and in pancreatic islets was reported (11, 37, 38). In our study, and confirming data from others, a HFD induced higher weight gain, disturbance in glycemic control, and increased beta cell function.

As expected, higher GSIS was associated with PYC expression and NAD(P)H production in normal and protein-malnourished obese mice. PYC is one of the most important enzymes from the pyruvate-citrate cycle, and its activity was directly associated with the control of insulin secretion and development of T2D (8, 39-42). In addition, enhanced NAD(P)H, observed in our obese mice, strengthens the notion that HFD-induced obesity up-regulates GSIS through increased metabolic coupling factors, produced by the pyruvate-citrate cycle (43). HFD-improved mitochondrial function was associated with the canonical transcription factors, PGC-1 $\alpha$  and Tfam. In beta cells, Tfam is associated with mitochondrial function, Ca<sup>2+</sup> signaling, and altered GSIS (44). It is also proposed that higher levels of PGC-1 $\alpha$  might lead to reduced GSIS (45-47). However, this subject is still controversial.

TAU supplementation restored insulin secretion and its sensitivity in peripheral tissues, as observed by others (27, 48). In contrast to what was reported in mice fed a normal protein diet, in a low-protein-fed group, TAU did not reduce GSIS, PYC, PGC-1 $\alpha$  and Tfam protein content, nor NAD(P)H production, after HFD challenge. These data provide evidence that, in obese mice, TAU might act on the reestablishment of GSIS through mitochondrial signaling, an effect absent in protein-malnourished mice. Indeed, TAU supplementation restored several alterations in mitochondria from pancreatic islets in protein-malnourished and obese rodents (49, 50). However, the intracellular pathways by which TAU might signal are still poorly understood. Our data provide evidence that TAU acts on beta cells, at least in part, through the PGC-1 $\alpha$ /Tfam pathway, reducing their levels after HFD feeding in the CH group. However, protein malnutrition blunted the signaling capacity of TAU.

The control of PGC-1 $\alpha$  gene transcription and its protein activation is complex. It can be modulated by several nutrient-sensing pathways and hormonal signaling cascades, and it interacts with a large number of transcription factors depending on its phosphorylation and acetylation state (51). Our data showed that protein malnourishment, followed by HFD, seems to disrupt TAU signaling, at least in the transcription of PGC-1 $\alpha$ .

We thought that the lack of effects of TAU on protein-malnourished obese mice may be at least partially associated with a lower expression of Tau-T in RH pancreatic islets after HFD challenge. Tau-T is the most relevant TAU transporter (16) in the cell, and the regulation of its activity may occur, in an acute and/or long-term manner, by different components, such as PKA and PKC activities and levels of TNF- $\alpha$  and NO (17-22, 24-26). Recently, a correlation between the physiological concentrations of IL-6 and the increased expression of factors involved with induction of the expression of Tau-T, such as increased AMPK and iNOS activity, and NO levels was reported [Krause and colleagues (52)]. We observed that a HFD increased IL-6 and STAT3 phosphorylation levels in CH and CHT mice only. Because leptin and IL-6 binding to cytokine-like receptors activates the JAK-STAT signaling pathway (53-56), and we have observed that plasma leptin levels are increased in CH and RH groups (31), we investigated the possible association between IL-6 fluctuation and the modulation of the expression of the Tau-T protein in Ob mice. However, Ob mice displayed increased expression of PGC-1 $\alpha$ , Tfam, and Tau-T proteins, suggesting no involvement of leptin on the modulation of these parameters in these mice. Finally, we incubated isolated pancreatic islets in the presence of IL-6 (50 pg/mL) and its inhibitor Tocilizumab and analyzed its effects on Tau-T protein expression. IL-6 increased Tau-T mRNA and protein levels. This increment was partially abolished when pancreatic islets were incubated in the presence of an IL-6 inhibitor, suggesting that this cytokine may participate in the modulation of the expression of Tau-T in CH and CHT groups and may explain why Tau-T levels remained unchanged in RH and RHT groups. This modulation is associated with increased AMPK and, possibly, iNOS activity, which generates factors that have been described as modulators of the expression of Tau-T gene. Nevertheless, this signaling control still remains to be investigated.

In conclusion, our data show that early life protein malnutrition does not favor the increment of insulin secretion induced by HFD. Protein malnutrition also impairs the reestablishment of mitochondrial dysfunction by TAU. This is based on the fact that PYC content and PGC-1 $\alpha$ /Tfam pathways were not affected by TAU. This lack of effects is at least partially due to the reduced levels of IL-6 in protein-malnourished mice fed an HFD that is responsible for the absence of increased expression of Tau-T.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT).

## Legends

### Table 1.

C: control; CH: control + high-fat diet; CHT: control + high-fat diet + Taurine; R: protein restriction; RH: protein restriction + high-fat diet; RHT: protein restriction + high-fat diet + Taurine. \*: significant differences compared to C,  $p < 0.05$ ; #: significant differences compared to CH,  $p < 0.05$ ; &: significant differences compared to R,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA plus Tukey's post-test or Student's t test).

## References

1. Wiederkehr, A., and Wollheim, C. B. (2012) Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Mol Cell Endocrinol* **353**, 128-137
2. Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C., and MacDonald, M. J. (2010) Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* **53**, 1019-1032
3. Maechler, P. (2012) Mitochondrial signal transduction in pancreatic beta-cells. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 739-752
4. Prentki, M., Matschinsky, F. M., and Madiraju, S. R. (2013) Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab* **18**, 162-185
5. Cappelli, A. P., Zoppi, C. C., Barbosa-Sampaio, H. C., Costa, J. M., Jr., Protzek, A. O., Morato, P. N., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2014) Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. *Liver Int* **34**, 771-783
6. Hasan, N. M., Longacre, M. J., Stoker, S. W., Boonsaen, T., Jitrapakdee, S., Kendrick, M. A., Wallace, J. C., and MacDonald, M. J. (2008) Impaired anaplerosis and insulin secretion in insulinoma cells caused by small interfering RNA-mediated suppression of pyruvate carboxylase. *J Biol Chem* **283**, 28048-28059
7. MacDonald, M. J., Longacre, M. J., Stoker, S. W., Brown, L. J., Hasan, N. M., and Kendrick, M. A. (2008) Acetoacetate and beta-hydroxybutyrate in combination with other metabolites release insulin from INS-1 cells and provide clues about pathways in insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C442-450
8. Fransson, U., Rosengren, A. H., Schuit, F. C., Renstrom, E., and Mulder, H. (2006) Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia* **49**, 1578-1586
9. Guay, C., Madiraju, S. R., Aumais, A., Joly, E., and Prentki, M. (2007) A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* **282**, 35657-35665
10. Duque-Guimaraes, D. E., and Ozanne, S. E. (2013) Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 525-535
11. Peterside, I. E., Selak, M. A., and Simmons, R. A. (2003) Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E1258-1266
12. Theys, N., Bouckennooghe, T., Ahn, M. T., Remacle, C., and Reusens, B. (2009) Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R1516-1525

13. da Silva, P. M., Batista, T. M., Ribeiro, R. A., Zoppi, C. C., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2012) Decreased insulin secretion in islets from protein malnourished rats is associated with impaired glutamate dehydrogenase function: effect of leucine supplementation. *Metabolism* **61**, 721-732
14. Hansen, S. H., Andersen, M. L., Cornett, C., Gradinaru, R., and Grunnet, N. (2010) A role for taurine in mitochondrial function. *J Biomed Sci* **17 Suppl 1**, S23
15. Schaffer, S. W., Azuma, J., and Mozaffari, M. (2009) Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* **87**, 91-99
16. Jacobsen, J. G., and Smith, L. H. (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological reviews* **48**, 424-511
17. Lambert, I. H., and Hoffmann, E. K. (1993) Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. *The Journal of membrane biology* **131**, 67-79
18. Hoffmann, E. K., and Lambert, I. H. (1983) Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. *The Journal of physiology* **338**, 613-625
19. Hansen, D. B., Friis, M. B., Hoffmann, E. K., and Lambert, I. H. (2012) Downregulation of the taurine transporter TauT during hypo-osmotic stress in NIH3T3 mouse fibroblasts. *The Journal of membrane biology* **245**, 77-87
20. Voss, J. W., Pedersen, S. F., Christensen, S. T., and Lambert, I. H. (2004) Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem* **271**, 4646-4658
21. Mollerup, J., and Lambert, I. H. (1996) Phosphorylation is involved in the regulation of the taurine influx via the beta-system in Ehrlich ascites tumor cells. *The Journal of membrane biology* **150**, 73-82
22. Mollerup, J., and Lambert, I. H. (1998) Calyculin A modulates the kinetic constants for the Na<sup>+</sup>-coupled taurine transport in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochimica et biophysica acta* **1371**, 335-344
23. Lambert, I. H., Jensen, J. V., and Pedersen, P. A. (2014) mTOR ensures increased release and reduced uptake of the organic osmolyte taurine under hypoosmotic conditions in mouse fibroblasts. *American journal of physiology. Cell physiology* **306**, C1028-1040
24. Kang, Y. S., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Tomi, M., Hosoya, K., and Terasaki, T. (2002) Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- $\alpha$ , taurine and hypertonicity. *Journal of neurochemistry* **83**, 1188-1195
25. Mochizuki, T., Satsu, H., and Shimizu, M. (2002) Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates taurine uptake and transporter gene expression in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* **517**, 92-96

26. Bridges, C. C., Ola, M. S., Prasad, P. D., El-Sherbeny, A., Ganapathy, V., and Smith, S. B. (2001) Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1825-1836
27. Ribeiro, R. A., Santos-Silva, J. C., Vettorazzi, J. F., Cotrim, B. B., Mobiolli, D. D., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2012) Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. *Amino Acids* **43**, 1791-1801
28. Batista, T. M., Ribeiro, R. A., Amaral, A. G., de Oliveira, C. A., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2012) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *J Nutr Biochem* **23**, 306-312
29. Vettorazzi, J. F., Ribeiro, R. A., Santos-Silva, J. C., Borck, P. C., Batista, T. M., Nardelli, T. R., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2014) Taurine supplementation increases K(ATP) channel protein content, improving Ca<sup>2+</sup> handling and insulin secretion in islets from malnourished mice fed on a high-fat diet. *Amino Acids* **46**, 2123-2136
30. Batista, T. M., Ribeiro, R. A., da Silva, P. M., Camargo, R. L., Lollo, P. C., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2013) Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* **57**, 423-434
31. Batista, T. M., Ribeiro, R. A., Amaral, A. G., de Oliveira, C. A. M., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2012) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry* **23**, 306-312
32. Bordin, S., Boschero, A. C., Carneiro, E. M., and Atwater, I. (1995) Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. *J Membr Biol* **148**, 177-184
33. Soriano, S., Gonzalez, A., Marroqui, L., Tuduri, E., Vieira, E., Amaral, A. G., Batista, T. M., Rafacho, A., Boschero, A. C., Nadal, A., Carneiro, E. M., and Quesada, I. (2010) Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated with multiple changes in the beta-cell stimulus-secretion coupling. *Endocrinology* **151**, 3543-3554
34. da Silva, P. M., Zoppi, C. C., Filiputti, E., Silveira, L. R., Quesada, I., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2010) Preliminary report: leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. *Metabolism* **59**, 911-913
35. Hales, C. N., and Barker, D. J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**, 5-20

36. Hales, C. N., and Barker, D. J. (2013) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol* **42**, 1215-1222
37. Park, H. K., Jin, C. J., Cho, Y. M., Park, D. J., Shin, C. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Cho, B. Y., and Lee, H. K. (2004) Changes of mitochondrial DNA content in the male offspring of protein-malnourished rats. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 205-216
38. Mayeur, S., Lancel, S., Theys, N., Lukaszewski, M. A., Duban-Deweer, S., Bastide, B., Hachani, J., Cecchelli, R., Breton, C., Gabory, A., Storme, L., Reusens, B., Junien, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2013) Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E14-22
39. Han, J., and Liu, Y. Q. (2010) Reduction of islet pyruvate carboxylase activity might be related to the development of type 2 diabetes mellitus in Agouti-K mice. *J Endocrinol* **204**, 143-152
40. Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., and Prentki, M. (2000) Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* **49**, 718-726
41. Sugden, M. C., and Holness, M. J. (2011) The pyruvate carboxylase-pyruvate dehydrogenase axis in islet pyruvate metabolism: Going round in circles? *Islets* **3**, 302-319
42. Xu, J., Han, J., Long, Y. S., Epstein, P. N., and Liu, Y. Q. (2008) The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* **51**, 2022-2030
43. Quinlan, T. R., Berube, K. A., Marsh, J. P., Janssen, Y. M., Taishi, P., Leslie, K. O., Hemenway, D., O'Shaughnessy, P. T., Vacek, P., and Mossman, B. T. (1995) Patterns of inflammation, cell proliferation, and related gene expression in lung after inhalation of chrysotile asbestos. *Am J Pathol* **147**, 728-739
44. Silva, J. P., Kohler, M., Graff, C., Oldfors, A., Magnuson, M. A., Berggren, P. O., and Larsson, N. G. (2000) Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* **26**, 336-340
45. Raaphorst, G. P., and Azzam, E. I. (1981) The effect of hypo- and hypertonic NaCl solutions on cellular damage resulting from combined treatments of heat and X-rays. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* **40**, 633-643
46. Wilson, F. H., Hariri, A., Farhi, A., Zhao, H., Petersen, K. F., Toka, H. R., Nelson-Williams, C., Raja, K. M., Kashgarian, M., Shulman, G. I., Scheinman, S. J., and



Lifton, R. P. (2004) A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* **306**, 1190-1194

47. Yoon, J. C., Xu, G., Deeney, J. T., Yang, S. N., Rhee, J., Puigserver, P., Levens, A. R., Yang, R., Zhang, C. Y., Lowell, B. B., Berggren, P. O., Newgard, C. B., Bonner-Weir, S., Weir, G., and Spiegelman, B. M. (2003) Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Developmental cell* **5**, 73-83

48. Kim, K. S., Oh da, H., Kim, J. Y., Lee, B. G., You, J. S., Chang, K. J., Chung, H. J., Yoo, M. C., Yang, H. I., Kang, J. H., Hwang, Y. C., Ahn, K. J., Chung, H. Y., and Jeong, I. K. (2012) Taurine ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia by reducing insulin resistance and leptin level in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats with long-term diabetes. *Exp Mol Med* **44**, 665-673

49. Lee, Y. Y., Lee, H. J., Lee, S. S., Koh, J. S., Jin, C. J., Park, S. H., Yi, K. H., Park, K. S., and Lee, H. K. (2011) Taurine supplementation restored the changes in pancreatic islet mitochondria in the fetal protein-malnourished rat. *Br J Nutr* **106**, 1198-1206

50. Oprescu, A. I., Bikopoulos, G., Naassan, A., Allister, E. M., Tang, C., Park, E., Uchino, H., Lewis, G. F., Fantus, I. G., Rozakis-Adcock, M., Wheeler, M. B., and Giacca, A. (2007) Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes* **56**, 2927-2937

51. Puigserver, P., and Spiegelman, B. M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24**, 78-90

52. da Silva Krause, M., Bittencourt, A., Homem de Bittencourt, P. I., Jr., McClenaghan, N. H., Flatt, P. R., Murphy, C., and Newsholme, P. (2012) Physiological concentrations of interleukin-6 directly promote insulin secretion, signal transduction, nitric oxide release, and redox status in a clonal pancreatic beta-cell line and mouse islets. *J Endocrinol* **214**, 301-311

53. Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C. F., and Tartaglia, L. A. (1996) The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8374-8378

54. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20

55. Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H., and Skoda, R. C. (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6231-6235

56. Haan, C., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2002) Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem J* **361**, 105-111

Table 1

**Table 1 – Values of body mass, retroperitoneal fat pad, epididymal fat pad, fasting plasmatic insulin and glucose concentrations.**

	C	CH	CHT	R	RH	RHT
Body mass (g)	24.99±0.99	37.94±2.15*	31.47±1.33**	20.72±0.73*	27.20±1.25 <sup>Δ</sup>	29.57±1.32 <sup>Δ</sup>
Retroperitoneal fat pad(g/100g)	0.47±0.03	1.44±0.05*	1.12±0.04**	0.62±0.03*	1.18±0.06***	1.09±0.06***
Epididymal fat pad (g/100g)	1.28±0.06	3.85±0.19*	3.05±0.19**	1.62±0.10*	2.54±0.15***	2.64±0.20***
Fasting Glucose (mg/dL)	72,67±2,70	108,4±2,40*	80,20±3,55	76,25±10,20*	78,50±4,66	88,67±0,88
Fasting Insulin (ng/mL)	0,37±0,06	1,69±0,36*	0,82±0,15**	0,44±0,01 <sup>#</sup>	0,46±0,10*	0,49±0,17*

#### 4) ARTIGO 2

**Desnutrição proteica impede a restauração da sensibilidade muscular à insulina induzida por taurina via modulação da expressão da piruvato carboxilase e dos níveis de oxalacetato em camundongos desnutridos e alimentados com dieta rica em gordura**

**Renato Chaves Souto Branco<sup>1</sup>, Rafael Ludemann Camargo<sup>1</sup>, Patrícia Cristine Borck<sup>1</sup>, Lucas Henrique Montes Bomfim<sup>1</sup>, Leonardo dos Reis Silveira<sup>1</sup>, Cláudio Cesar Zoppi<sup>1</sup>, Antônio Carlos Boschero<sup>1</sup>, Everardo Magalhães Carneiro<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

***Título abreviado:*** Desnutrição proteica impede efeitos da taurina em musculo esquelético

***Número de figures e tabelas:*** 8

***Autor correspondente e endereço para contato:***

Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

13083-970 Campinas, SP, Brasil

Telefone: +55 (19) 974120778

e-mail: [renatocsb@gmail.com](mailto:renatocsb@gmail.com)

**Declaração de divulgação:** Os autores não possuem nada a declarar.

## Introdução

A má nutrição ainda atinge inúmeros países, especialmente pobres e em desenvolvimento. Uma série de estudos epidemiológicos apontam que má nutrição especialmente em fases iniciais do desenvolvimento estão associadas com maior risco de desenvolvimento de obesidade e DM2 na vida adulta (1, 2). Hales & Barker (2001) postularam a hipótese do fenótipo econômico, na qual afirmam que diante de exposições a restrição nutricional, alterações na homeostase glicêmica, possivelmente permanentes (programação metabólica), favoreceriam o fornecimento de nutrientes para tecidos periféricos sem afetar glicemia e composição corporal (3). Tal programação, entretanto, estaria relacionada com o desenvolvimento de resistência periférica à insulina, síndrome metabólica e co-morbidades.

A resistência à insulina em tecidos periféricos, foi associada a redução na capacidade oxidativa mitocondrial, o que é acompanhada de aumento no acúmulo intracelular de espécies lipídicas (4-7). Além disso, indivíduos com resistência à insulina apresentam aumento na expressão da proteína desacopadora-3 (UCP3), sugerindo reduzida capacidade mitocondrial para produzir energia (8, 9). Estudos *in vitro* e *in vivo*, mostraram que a exposição de músculo esquelético a excessivo suprimento de lipídios levou a acúmulo de moléculas derivadas do metabolismo de ácidos graxos o que foi associado a resistência muscular à insulina (10-12).

Postula-se que o mecanismo associado a instalação da resistência à insulina diante de excessivo suprimento de gorduras, se dá devido aos ácidos graxos de cadeia longa serem desviados da Carnitina Palmitoil Transferase-1 (CPT-1), a qual cataliza a reação limitante para o transporte de lipídios para a matriz mitocondrial, onde podem ser oxidados. Em contrapartida, essas moléculas são direcionadas para a formação de intermediários, tais como diacilgliceróis (DAG) e ceramidas, ambas associadas a resistência muscular à insulina (11, 13). Todavia, alguns trabalhos tem ido de encontro a esses achados. Manipulações genéticas que induzam aumento no acúmulo de lipídios não necessariamente levam a resistência muscular à insulina (14, 15). Nesse sentido, trabalhos mais recentes tem mostrado que a resistência muscular à insulina está associada a uma sobrecarga de nutrientes, especialmente lipídios, para mitocôndria. O aumento na taxa beta-oxidativa resultaria na geração de intermediários lipídicos provenientes da oxidação incompleta dos ácidos graxos (16-19). Esse cenário seria resultado da incapacidade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) em escoar a produção de acetil-CoA proveniente da beta-oxidação, o que levaria ao acúmulo de

intermediários lipídicos, tais como as acilcarnitinas (16, 20-22), levando a resistência à insulina. Nesse sentido, um estudo mostrou que pacientes diabéticos apresentam redução no fluxo do TCA e consequentemente redução na capacidade de oxidar ácidos graxos (23), o que suporta o que foi discutido anteriormente.

Dietas pobres em proteína levam a severo prejuízo da função muscular. Trabalhos indicam que ratos desnutridos apresentam redução do peso de tecido muscular e prejuízos na morfologia, metabolismo e desenvolvimento muscular (24-26). Foi demonstrado que a exposição a desnutrição protéica por um curto período de tempo aumenta a sensibilidade muscular à insulina (27). Essa associação de efeitos entre desnutrição proteica e sensibilidade a insulina em músculo esquelético se dá pela melhora em diversos componentes moleculares da cascata da insulina, tais como aumento da translocação de GLUT-4, aumento dos níveis de fosforilação em resíduo de tirosina de IRS-1 e redução dos níveis de fosforilação em resíduos de serina (28-30). Por outro lado, os efeitos a longo prazo, parecem ser opostos.

A investigação dos efeitos a longo prazo da má nutrição em músculo esquelético da prole de ovelhas grávidas mostrou diversas alterações metabólicas em músculo esquelético (31). Apesar do aumento na proporção de fibras musculares do tipo II, observou-se redução dos níveis de GLUT-4 e aumento no acúmulo de lipídios intramuscular, o que foi associado a redução na oxidação de ácidos graxos, a julgar pela redução de 25% na atividade da CPT-1 e redução na expressão da ATP sintase. Evidências para reduzido fluxo do TCA foi gerada por Lane e colaboradores (32). Esses autores mostraram que ratos com retardamento de crescimento apresentam redução na razão  $NAD^+ : NADH$ , mesmo sem alterações na atividade da isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase, sugerindo que outros pontos podem contribuir para as alterações (33).

Postula-se que nessas situações de decréscimo na sensibilidade a insulina, a redução do fluxo do TCA possa contribuir para tal quadro. Todavia, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para esclarecer se, de fato, esse processo contribui para as alterações observadas no quadro de desnutrição proteica. Além do mais, ainda não foi mostrado a relação entre fluxo do TCA e aumento da sensibilidade a insulina em quadros de desnutrição.

Nos últimos anos o nosso grupo de pesquisa vêm mostrando efeitos benéficos da suplementação com Taurina (TAU) em condições de desnutrição proteica e obesidade induzida por dieta ou genética. A TAU, ou ácido 2-aminoetanossulfônico, é um aminoácido não essencial que contém enxofre e está presente em altas concentrações em neonatos, principalmente no cérebro. Estudos epidemiológicos mostraram que pacientes diabéticos

apresentam reduzidos níveis circulantes de TAU, sugerindo deficiência de ingestão ou de síntese deste aminoácido (34, 35).

A TAU regula a homeostase glicemia/energética, atuando nos tecidos periféricos e regulando expressões de peptídeos hipotalâmicos. Recentemente um estudo com miotubos L6 mostrou que TAU aumenta a captação de glicose e esse efeito está relacionado com a ativação de uma importante enzima do metabolismo energético, comumente relacionado a instalação da resistência periférica a insulina, a AMPK, do inglês, AMP-activated protein kinase (36). TAU é capaz de melhorar hiperglicemia e dislipidemia em modelo de obesidade e diabetes em roedores por reduzir a resistência periférica à insulina (37). Entretanto em nossos trabalhos observamos que os efeitos da TAU desaparecem em animais desnutridos que foram alimentados com HFD. Os mecanismos pelos quais esse aminoácido perde sua eficácia nessa situação ainda não foram esclarecidos.

### **Objetivo**

Investigamos se as características descritas pela hipótese do fenótipo econômico favoreceriam a instalação da resistência muscular a insulina devido a disfunções metabólicas em camundongos submetidos a restrição proteica após o desmame e em seguida, alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, investigamos se a suplementação com TAU seria capaz de prevenir tais alterações.

### **Materiais e Métodos**

#### **Animais**

O comitê de ética para experimentação animal da UNICAMP aprovou todos os experimentos descritos a seguir (protocolo n. 2827-1). Camundongos C57BL6 machos com 30 dias de vida foram mantidos em temperatura controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), em ciclo de luz 12h claro-escuro, com acesso livre a ração e água.

Os camundongos foram agrupados randomicamente em dois grupos, como seguem: camundongos alimentados com dieta com teor normal de proteínas (14%) (Grupo controle: C, n=45) ou camundongos alimentados com dieta com baixo teor de proteínas (6%) (Grupo restrito: R, n=45). Após 6 semanas, os grupos C e R foram subdivididos e receberam ou não, dieta rica em gorduras (35%) pelas próximas 8 semanas (Grupos CH e RH). Metade do número de camundongos de ambos os grupos receberam, na água de beber, 5% de TAU do início do protocolo experimental até o dia da eutanásia.

As dietas, mistura de vitaminas e mistura de minerais, cujas composições encontram-se descritas no Tabela 1, foram adquiridas comercialmente da empresa Pragsoluções (Jaú-SP). A

dieta controle segue as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) para roedores nas fases de crescimento, gravidez e lactação.

#### **PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

##### **Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)**

Os animais foram mantidos em jejum por 12 h. Após a verificação da glicemia de jejum com o aparelho Accu-Check Advantage II, uma solução de glicose a 50% (2,0 g/Kg de massa corpórea) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. A glicemia foi verificada nos tempos 0, 15, 30, 60, 90, 120 min.

##### **Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)**

Os animais foram mantidos alimentados. Após a verificação da glicemia, no estado alimentado com o aparelho Accu-Check Advantage II, a insulina (1,5U/kg de massa corpórea) diluída em solução salina (0,9% de NaCl) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. A glicemia foi verificada nos tempos 0, 10, 15, 30, 45 e 60 min.

##### **Determinação da taxa respiratória de camundongos/Avaliação da taxa metabólica basal (Respirometria)**

Após 24 horas de aclimação ao sistema, e com os animais em completo repouso, foram medidos o consumo de oxigênio e produção de CO<sub>2</sub> em gaiolas metabólicas totalmente seladas utilizando o sistema Oxylet system (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha) por igual período. A partir desses dados foi feito o cálculo do coeficiente respiratório (RQ) dos animais utilizando-se o software Metabolism® (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha) acoplado ao sistema.

##### **Determinação da concentração de metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos**

Para a dosagem malato, alfa-cetoglutarato e oxalacetato músculo esquelético gastrocnêmio foi extraído, lavado com PBS e rapidamente submetido ao processo de extração de metabólitos utilizando 400uL de ácido perclórico 50% para cada amostra. Os intermediários foram dosados, com breves adaptações com base no livro “Methods of enzymatic analysis”, H.U Bergmeyer (1965). Para a realização da curva padrão, todos os intermediários foram preparados na concentração de 500uM e diluídos conforme o valor da curva. Para alfa-cetoglutarato foram utilizados os seguintes componentes: tampão Fosfato em pH 6,8 à 25°C, tampão Carbonato no pH 10,6, NADH (200uM), NH<sub>4</sub> (36mM), ADP (2mM), glutamato Desidrogenase (9U/mL). Para malato foram utilizados os seguintes componentes: Hidrazina-glicina em pH 9 à 37°C, malato desidrogenase (0,6U/mL), NAD<sup>+</sup> (15mM). Para o



oxalacetato foram utilizados os seguintes componentes: tampão Fosfato pH 6,8 à 25°C, malato desidrogenase (216mU/mL), NADH (450uM) diluído em tampão Carbonato pH 10,6.

#### **Determinação da concentração de proteína e triacilgliceróis totais músculo gastrocnêmio**

Para determinação da concentração protéica foi utilizado o método de Bradford (1976). Para dosagem de triacilgliceróis (TAG) totais foi utilizado o KIT (), os procedimentos foram realizados segundo instruções do fabricante.

#### **Western Blot**

Os experimentos de Western Blot foram realizados como previamente descritos por Filiputti et al. (2010). O homogenato do músculo gastrocnêmio, foram colocadas em um tubo de 1,5 ml e adicionados de coquetel anti-protease contendo ortovanadato de sódio (1,8 mg/mL), aprotinina (0,01 mg/mL) e PMSF (0,36 mg/mL). As proteínas das amostras foram então separadas em SDS-PAGE de 8-10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos específicos (piruvato carboxilase – Sc-46229; fosfofrutoquinase-1 Sc-67028; lactato desidrogenase –Sc-33781; proteína quinase-B – Sc-5298 (Santa Cruz Biotechnology); ATP-citrato liase - #4332; piruvato desidrogenase - #2784 (Cell Signaling); PGC-1 $\alpha$  (#42595 – Cell Signaling); Tfam (Sc-376672 – Santa Cruz Biotechnology); phospho-AMPK (#2535); AMPK Total (#2532 – Cell Signaling); phospho-ACC (3661 – Cell Signaling); ACC Total (3662 – Cell Signaling)) na diluição 1:1000 e, posteriormente detectadas por exposição à substância quimioluminescente (luminol e peroxidase) seguida de revelação em um fotodocumentador GE. A quantificação das bandas foi feita por densitometria utilizando o software ImageJ.

#### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram submetidos ao teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA) entre os dois grandes grupos controles e restritos através do programa GraphPad Prism® versão 5.0, usando como intervalo de confiança 95%.

#### **Resultados**

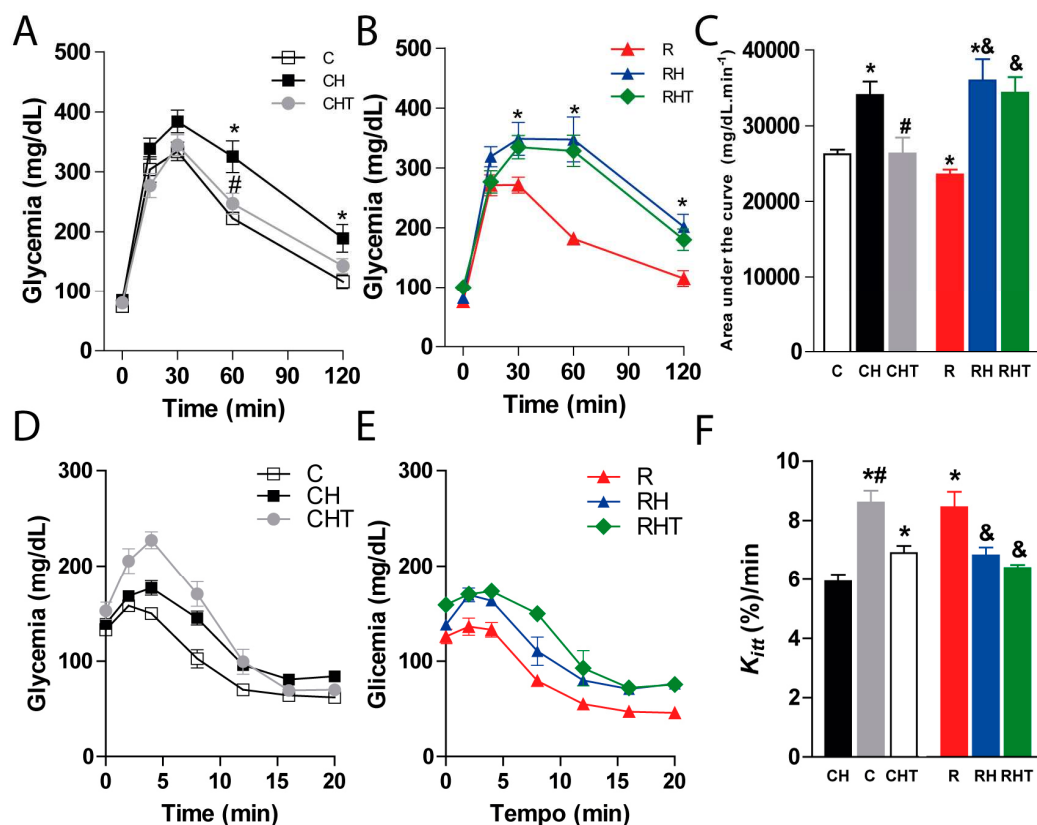
##### **Taurina preveniu intolerância à glicose e à insulina induzida por dieta rica em gordura em CHT**

A análise da área sob a curva (AUC) do GTT (figura 1C) nos mostra que animais desnutridos apresentam maior tolerância à glicose e que tanto camundongos controle, que receberam dieta normoprotéica, quanto desnutridos, alimentados com HFD, tornaram-se intolerantes à glicose. A AUC foi 39,80% menor em R e 70,48% maior em CH quando

comparados a C e 123% em RH comparado a R. Assim como nos parâmetros anteriores, a suplementação com TAU melhorou a tolerância à glicose em 30,87% apenas no grupo CHT (figura 1A, 1B e 1C).

A análise do KiTT (constante de decaimento da glicemia durante o ITT) (figura 1E) mostra uma diminuição de 15% e 20% no valor calculado do KiTT dos animais CH e RH em relação ao controle e desnutridos, respectivamente, sugerindo uma menor sensibilidade periférica à insulina. Por outro lado, o consumo de dieta pobre em proteína aumentou esse parâmetro em 28% em R quando comparado a C, caracterizando um quadro de maior sensibilidade periférica ao hormônio (figura 1E). TAU manteve a sensibilidade a julgar pelo cálculo do KiTT apenas em animais CHT (45% maior quando comparado a CH).  $P < 0,05$  para os parâmetros descritos.

**Figura 1**



**Figura 1:** Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT). (A) Grupos C, CH e CHT; (B) Grupos R, RH e RHT; (C) Área abaixo da curva. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \* Representa diferença entre o grupo C, # representa diferença entre o grupo R, \$ efeito da tau no HFD dos grupos C,  $p < 0,05$ . Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT). (D) Grupos C, CH e CHT; (E) Grupos R, RH e RHT; (F) Área abaixo da curva.

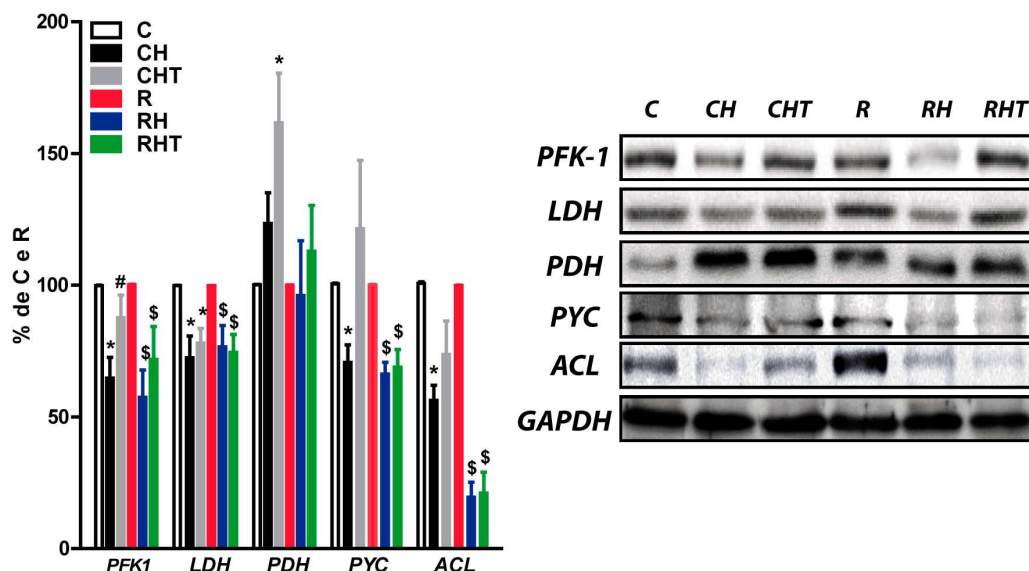


**Figura 2:** Análise da taxa de fosforilação da proteína quinase B (AKT) em músculo gastrocnêmio (A). Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . Conteúdo de triglicérides em músculo gastrocnêmio de camundongos C, CH, CHT, R, RH e RHT (B). Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo controle  $p < 0,05$ , & representa diferença estatística comparado ao grupo restrito,  $p < 0,05$ , # representa diferença estatística comparado ao grupo CH  $p < 0,05$ .

### **Taurina preveniu redução na expressão de enzimas do metabolismo glicolítico e mitocondrial em CHT**

A figura 3B mostra que a desnutrição proteica e HFD induziram alterações na expressão de enzimas metabólicas importantes relacionadas ao metabolismo glicolítico e mitocondrial. A dieta rica em gorduras reduziu a expressão da LDH, PFK-1, PYC e ACL em 28%, 36%, 38% e 43%, respectivamente, em animais do grupo CH em relação ao grupo C. Em relação ao grupo RH, essa redução, para as mesmas enzimas, foi de 24%, 41%, 31% e 43%, respectivamente, quando comparado aos animais do grupo R. A suplementação com TAU preveniu essa redução na expressão da PFK-1 e PYC, sendo os valores relativos 43% e 48% maiores em CHT quando comparado a CH.  $P < 0,05$  para todos os parâmetros descritos.

**Figura 3**



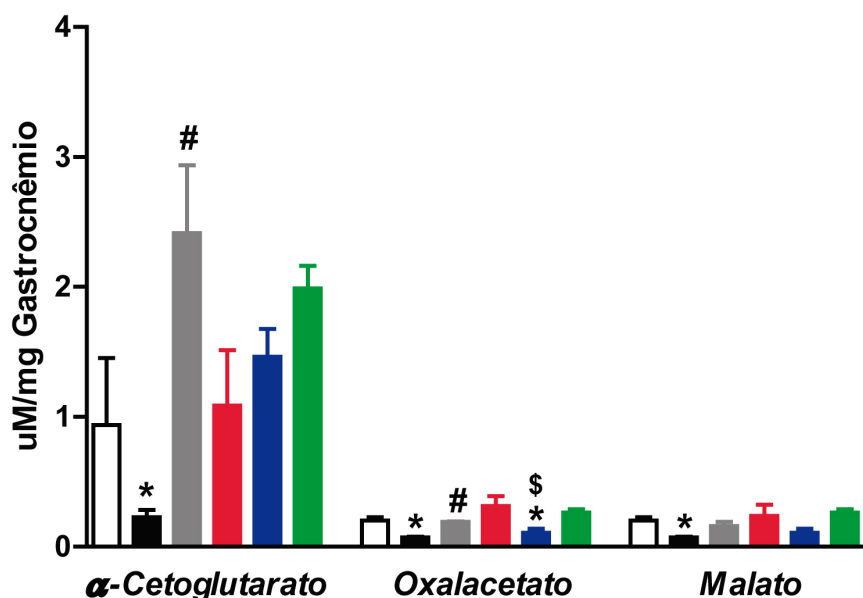
**Figura 3:** Análise do conteúdo protéico em músculo gastrocnêmio das enzimas: Fosfofrutoquinase-1, Lactato Desidrogenase, Piruvato Carboxilase, ATP-Citrato Liase, Piruvato Desidrogenase. Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e

pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo controle ou restrito,  $p < 0,05$ . # representa diferença estatística comparado ao grupo CH  $p < 0,05$ . \$ representa diferença estatística comparado ao grupo R,  $p < 0,05$ .

#### **Dieta rica em gordura reduziu os níveis de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos**

Para analisar o fluxo do TCA, dosamos os seguintes intermediários: alfa-cetoglutarato, oxalacetato e malato no músculo gastrocnêmio. De forma geral, a HFD reduziu o fluxo do TCA em CH e RH, enquanto a suplementação com TAU promoveu aumento nos níveis dos intermediários metabólicos do ciclo tanto em CHT quanto em RHT. A figura 4B mostra as concentrações de oxalacetato. O tratamento com HFD promoveu redução nos níveis de oxalacetato tanto em animais do grupo CH quanto em animais do grupo RH, quando comparado ao C e ao R, respectivamente ( $C = 0.2016 \pm 0.02556$  vs.  $CH = 0.07148 \pm 0.006491$  e  $R = 0.3129 \pm 0.07685$  vs.  $RH = 0.1092 \pm 0.02847$ ,  $p < 0,05$ ). A suplementação com TAU restabeleceu os níveis de oxalacetato em animais do grupo CHT ( $CH = 0.07148 \pm 0.006491$  vs.  $CHT = 0.1907 \pm 0.003896$ ,  $p < 0,05$ ) e apesar de uma forte tendência de aumento, os níveis desse metabólito não foram significativamente diferentes entre RHT e RH ( $RH = 0.1092 \pm 0.02847$  vs.  $RHT = 0.2638 \pm 0.02349$ ,  $p < 0,05$ ). Na figura 4C a análise dos níveis de malato nos mostra que o tratamento com HFD induziu alteração somente no grupo CH, reduzindo sua concentração em 67% quando comparado ao grupo C ( $C = 0.4687 \pm 0.07678$  vs.  $CH = 0.2076 \pm 0.01903$ ,  $p < 0,05$ ). Pela análise com o teste t detectamos um aumento significativo de 55% nos níveis de malato induzido pela suplementação com TAU no grupo CHT ( $CH = 0.2076 \pm 0.01903$  vs.  $CHT = 0.3105 \pm 0.0088$ ,  $p < 0,05$ ).

**Figura 4**



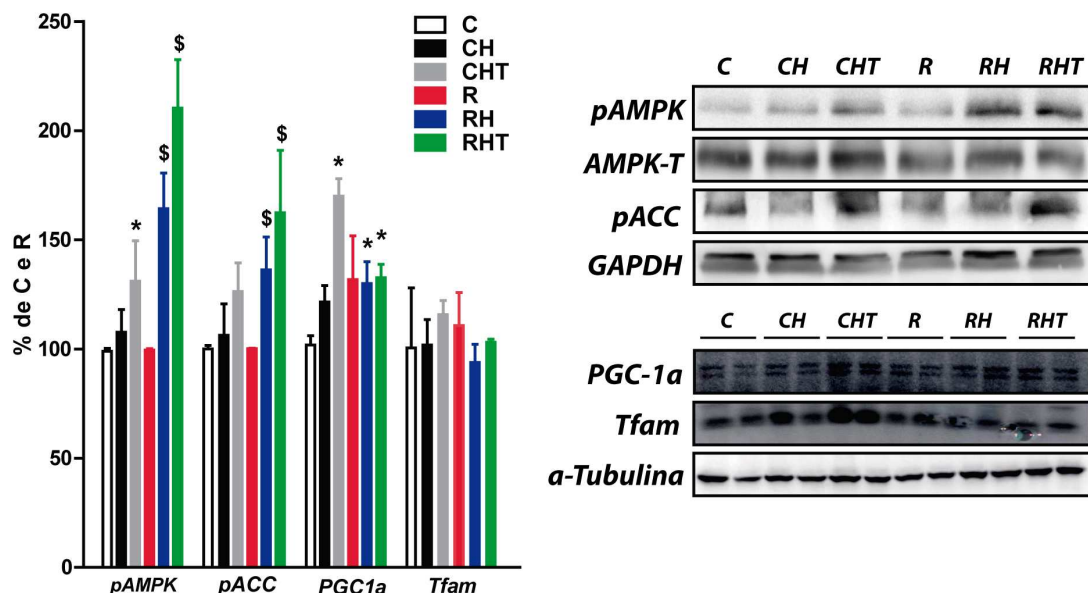
**Figura 4:** Análise do conteúdo de Alfa-cetoglutarato, Oxalacetato e Malato em músculo gastrocnêmio. Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo controle e \$ representa diferença estatística comparado ao restrito,  $p < 0,05$  # representa diferença estatística comparado ao CH,  $p < 0,05$   $n = 3$ .

#### **Taurina aumenta a fosforilação de AMPK e ACC em músculo gastrocnêmio**

A fim de investigarmos os mecanismos moleculares que podem estar contribuindo para a modulação metabólica da instalação da resistência a insulina no tecido muscular, avaliamos o grau de fosforilação de duas enzimas chaves do metabolismo energético: a quinase ativada por AMPc -alfa (AMPK) e a acetil-CoA carboxilase (ACC). A figura 5A mostra o grau de fosforilação da AMPK nos diferentes grupos experimentais. Não observamos diferenças significativas na fosforilação da AMPK entre os grupos C, CH, assim como entre os grupos C e R. Entretanto, o tratamento com HFD induziu um aumento de 64% na fosforilação da AMPK em animais do grupo RH, quando comparado ao grupo R. A suplementação com TAU não teve efeitos sobre a fosforilação da AMPK mantendo o grau de fosforilação 110% maior em RHT quando comparado aos animais do grupo R, todavia aumentou em aproximadamente 40% a taxa de fosforilação da enzima em CHT.  $P < 0,05$  para todos os parâmetros descritos.

A figura 5B mostra o nível de fosforilação da ACC, uma proteína alvo da AMPK. Assim como observado com a AMPK, não detectamos alterações na fosforilação da ACC entre os grupos C, CH. Todavia, o tratamento com HFD induziu um aumento de 37% na fosforilação da ACC no grupo RH, quando comparado ao R. A TAU também não alterou este padrão na fosforilação da ACC em RHT, entretanto, induziu aumento de 28% em CHT.  $P < 0,05$  para todos os parâmetros descritos.

**Figura 5**

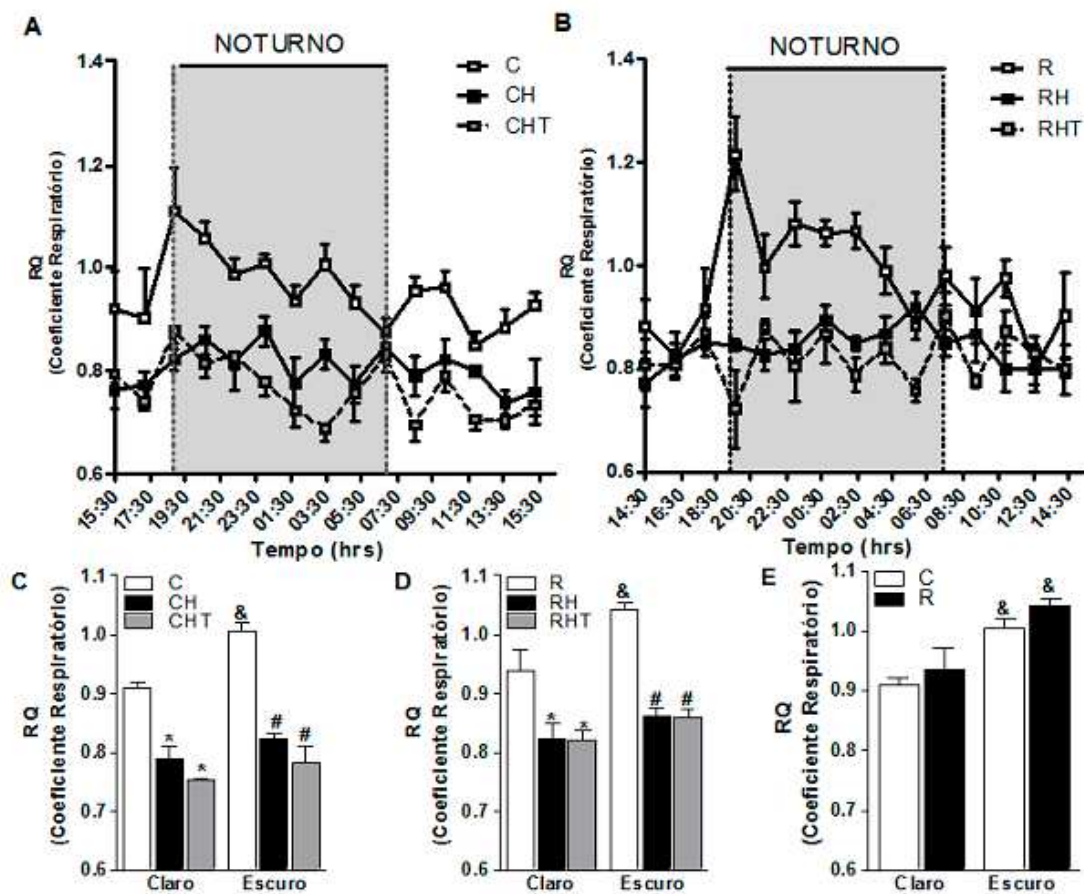


**Figura 5.** Análise da fosforilação da AMPK, ACC e da expressão protéica de PGC-1 $\alpha$  e Tfam em músculo gastrocnêmio. Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo controle ou restrito,  $p < 0,05$   $n = 8-11$ .

**Taurina não reverte o quadro de inflexibilidade metabólica induzida por dieta rica em gordura**

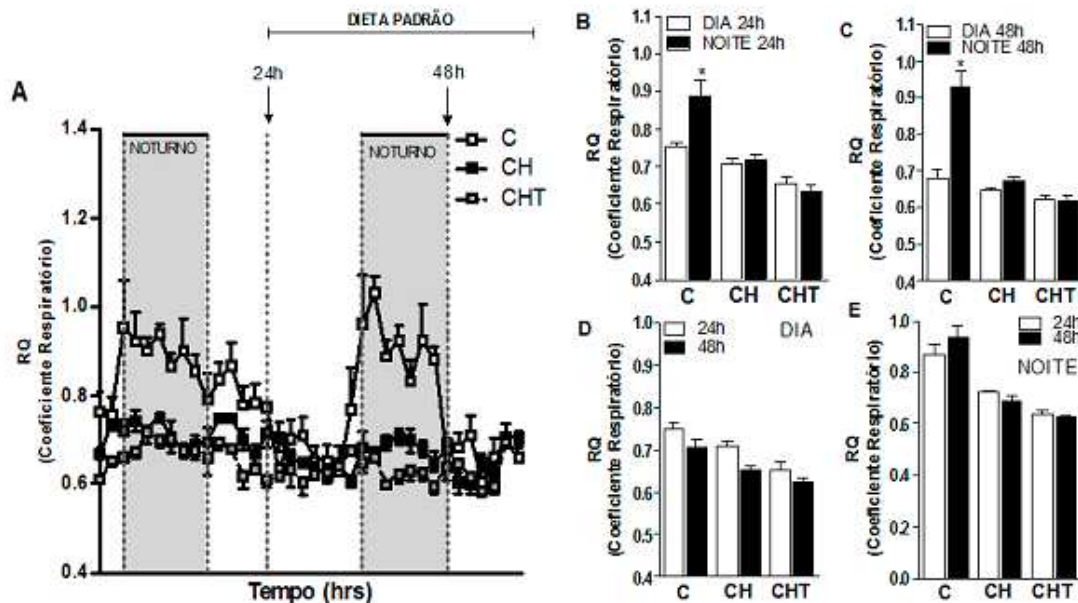
A figura 6 mostra análise da variação do coeficiente respiratório (RQ) entre o período noturno (n) e diurno (d) entre os grupos controles e restritos (figura 6C e 6D, respectivamente), mostra que a HFD induziu um quadro de inflexibilidade metabólica tanto em animais do grupo CH quanto do grupo RH quando comparado aos grupos C e R, respectivamente ( $Cd = 0.9079 \pm 0.01138$ ;  $Cn = 1.004 \pm 0.01625$ ;  $CHd = 0.7911 \pm 0.01827$ ;  $CHn = 0.8229 \pm 0.01107$ ;  $Rd = 0.9367 \pm 0.03611$ ;  $Rn = 1.043 \pm 0.01236$ ;  $RHd = 0.8246 \pm 0.02207$ ;  $RHn = 0.8612 \pm 0.01478$ ,  $p < 0,05$ ). Independentemente do grupo avaliado a suplementação com TAU não teve efeitos sobre esse quadro ( $CHTd = 0.7525 \pm 0.004494$ ;  $CHTn = 0.7818 \pm 0.02971$ ;  $RHTd = 0.8202 \pm 0.01457$ ;  $RHTn = 0.8583 \pm 0.01502$ ). A figura 6 mostra análise da variação do coeficiente respiratório (RQ) durante 48h dos animais controles (grupos C, CH e CHT). Avaliamos inicialmente esses três grupos experimentais para verificar se as melhoras observadas em animais CHT refletiria em reverteria o quadro de inflexibilidade metabólica observado nesses grupo. Nas primeiras 24h, os animais do grupo C receberam ração contendo 14% de proteína e os animais dos grupos CH e CHT receberam HFD. Após esse período, todos os grupos foram alimentados com ração 14% e com apenas 5% de gordura, sendo avaliados pelas 24h subseqüentes. Observamos que o tratamento crônico com HFD induziu um quadro de inflexibilidade metabólica não existindo variações no RQ entre período diurno e noturno durante as primeiras 24h como observado na figura 7A e 7B ( $Cd = 0.7514 \pm 0.01146$ ;  $Cn = 0.8895 \pm 0.04052$ ;  $Chd = 0.7084 \pm 0.01203$ ;  $CHn = 0.7185 \pm 0.01231$ ;  $CHTd = 0.6554 \pm 0.01695$ ;  $CHTn = 0.6338 \pm 0.01561$ ). A figura 7C nos mostra que mesmo consumindo uma ração com baixo teor de gorduras os animais do grupo CH e CHT se mantiveram metabolicamente inflexíveis ( $Cd = 0.6786 \pm 0.02844$ ;  $Cn = 0.9293 \pm 0.04717$ ;  $CHd = 0.6461 \pm 0.008533$ ;  $CHn = 0.6734 \pm 0.008348$ ;  $CHTd = 0.6261 \pm 0.007559$ ;  $CHTn = 0.6213 \pm 0.01161$ ). Observamos ainda que não houve diferenças entre os valores de RQ entre a avaliação de 24h e 48h durante o período diurno ou noturno (figura 7D e 7E).

Figura 6



**Figura 6.** Análise do coeficiente respiratório (RQ). Vinte e quatro horas de C, CH e CHT (A), de R, RH e RHT (B), média RQ dos períodos diurnos e noturnos para C, CH e CHT (C), média RQ dos períodos diurnos e noturnos para R, RH, RHT (D) e média RQ dos períodos diurnos e noturnos para C e R (E). Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo C(claro) ou R(claro),  $p < 0,05$ ; & representa diferença estatística comparando C(escuro) ao C(claro) e R(escuro) ao R(claro),  $p < 0,05$ ; # representa diferença estatística comparado ao C(escuro) ou R(escuro),  $p < 0,05$   $n = 4$ .



**Figura 7**

**Figura 7.** Análise do coeficiente respiratório (RQ). Quarenta e oito horas para os grupos C, CH e CHT (A), média RQ das primeiras 24h para os períodos diurnos e noturnos (B), média RQ das primeiras 48h para os períodos diurnos e noturnos (C), média RQ 24h e 48h no período diurno (D) média RQ 24h e 48h no período noturno (E). Os valores representam a média  $\pm$  epm.  $p < 0.05$ . One-way ANOVA e pós-teste de Tukey e teste "t" de student. \* representa diferença estatística comparado ao grupo Cd ou Rd,  $p < 0,05$   $n = 4-6$ .

### Discussão

Os dados aqui apresentados confirmam o que nosso grupo de pesquisa mostrou anteriormente (38-41), ressaltando que a restrição proteica precoce leva a alterações na homeostase glicêmica. Nossos animais desnutridos (R) tornaram-se mais tolerantes a glicose e mais sensíveis a insulina. Por outro lado, trabalhos de nosso e de outros grupos de pesquisa mostram que a HFD em longo prazo induz a instalação de um quadro de intolerância a glicose e resistência à insulina (42-44). Tanto camundongos controle, quanto desnutridos, desenvolveram intolerância à glicose e resistência à insulina quando alimentados com HFD por 60 dias. Novamente, a suplementação com Taurina (TAU) melhorou o quadro de intolerância à glicose, apenas em camundongos controles alimentados com HFD. Ribeiro et al. (2012) encontrou resultados semelhantes e mostrou que TAU melhorou a intolerância à glicose em camundongos *Swiss* obesos induzidos por dieta (42). Todavia, ainda não estão completamente claros quais são os mecanismos responsáveis por esse efeito e quais as razões para TAU não melhorar o perfil glicêmico em animais desnutridos.

Ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos envolvidos na causa da resistência à insulina. O tecido muscular esquelético é o sítio de maior captação de glicose induzida por insulina em humanos (45, 46). Na obesidade ocorrem alterações em diversos pontos da via de transdução do sinal desse hormônio, com redução na expressão e atividade da via IR/ IRS-1 e IRS-2/ PI3K, além da menor fosforilação da proteína quinase-B (p-Akt), que resulta em déficit dos efeitos desse hormônio sobre a translocação de GLUT4 para membrana plasmática (47-49).

Não somente o excesso de calorias, mas também a restrição alimentar, como a restrição proteica e calórica, durante a gestação, lactação e início do desenvolvimento produzem mudanças morfológicas nas ilhotas pancreáticas, culminando em menor secreção de insulina. No entanto, esses animais são capazes de manter a normoglicemia até a fase adulta, sugerindo uma adaptação periférica à ação do hormônio (50). Reis et al (1997), mostraram hipoinsulinemia e normoglicemia durante o GTT em ratos desnutridos. Ainda, o músculo desses animais tem maior fosforilação em tirosina de IR e IRS-1 bem como maior associação dessa última com a subunidade p85 da PI3K (28). Sharma e colaboradores (2012), mostraram que ratos que sofreram restrição calórica apresentam maior fosforilação da proteína quinase-B (p-Akt) no estado de jejum e induzida por insulina em músculo esquelético (51).

Postula-se desde o início da década passada, que existe uma relação próxima entre a disfunção do metabolismo oxidativo mitocondrial com a resistência à insulina. Trabalhos mostraram que a atividade de enzimas oxidativas e a oxidação de lipídios estão reduzidas em músculo de indivíduos obesos e resistentes à insulina (4, 52, 53). Nos últimos anos muitos dos trabalhos gerados nessa área mostraram redução na expressão de subunidades protéicas da cadeia respiratória (54) e na atividade de enzimas oxidativas mitocondriais (54, 55). Estudos em roedores mostraram alterações semelhantes em proteínas importantes do metabolismo mitocondrial induzida por HFD ou em quadro de obesidade genética (56-60).

Dados como os citados acima, evidenciam a relação entre disfunção mitocondrial e resistência à insulina. O inverso também é verdadeiro, a literatura mostra que intervenções que melhorem a sensibilidade muscular à insulina são acompanhadas de melhora na função mitocondrial. Um exemplo, a restrição calórica aumenta a sensibilidade à insulina (61, 62) e estimula fortemente a biogênese mitocondrial em músculo esquelético (63, 64). Outro estudo mostrou que o tratamento com resveratrol aumentou a atividade de um importante fator de transcrição relacionado à biogênese e função mitocondrial, o PGC-1 $\alpha$ ,

com subsequente aumento do metabolismo mitocondrial e aumento da sensibilidade à insulina em camundongos (65).

Recentemente uma nova linha de evidências, sugere que a disfunção mitocondrial não é a causa inicial para a lipotoxicidade e resistência à insulina. Trabalhos têm mostrado que o excesso do fornecimento de lipídios para roedores, por exemplo, através da alimentação com dieta rica em gorduras, na verdade aumenta a capacidade de oxidar lipídios intramusculares por aumentar a expressão de muitas enzimas mitocondriais e peroxissomais importantes para o metabolismo de ácidos graxos (22, 66-70). Usher e colegas (2010) observaram um aumento da atividade da  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase, uma enzima chave para o funcionamento da  $\beta$ -oxidação (71). Nesse sentido, essa idéia ganha suporte pelo fato de em alguns modelos animais, como o nosso de restrição protéica, ou mesmo em humanos atletas, existe maior tolerância à glicose associada à maior sensibilidade a insulina, apesar do excesso de TAG intramuscular (16, 71-74). Koves e colaboradores (2008) mostraram que obesidade, diabetes e a alimentação com uma dieta hiperlipídica estão relacionadas com um aumento na taxa de  $\beta$ -oxidação em músculo esquelético e que intervenções, sejam elas farmacológicas, nutricionais ou genéticas, que suprimam o transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria previnem o desenvolvimento do quadro de resistência à insulina induzida por lipídios (Koves *et al.*, 2008). Além disso, recentemente, Keung e colaboradores (2012), mostraram que a inibição farmacológica da CPT-1 melhora a resistência insulínica em músculo gastrocnêmio de camundongos alimentados com HFD (17).

Nesse sentido, nós mostramos que a dieta HFD causou redução na expressão de enzimas do metabolismo glicolítico e mitocondrial. Esses dados vão de encontro com o que foi discutido acima, sugerindo que possivelmente a redução da expressão dessas enzimas, resulta em redução nos níveis de intermediários metabólicos do metabolismo de carboidratos, responsáveis por manter o fluxo de carbonos pelo TCA. Esse prejuízo, que conseqüentemente resulta em um quadro de inflexibilidade metabólica, associado a um reduzido fluxo de carbonos pelo TCA, resultaria em um aumento de intermediários da  $\beta$ -oxidação incompleta, gerando produtos responsáveis por reduzir o sinal disparado pela insulina. Assim sendo, mostramos que possivelmente a TAU exerça efeitos sobre a modulação metabólica, por aumentar a expressão de enzimas chave para manutenção de um fluxo de carbonos adequado pelo TCA, especialmente a PYC. A suplementação com TAU preservou os níveis de expressão da PYC em animais do grupo CHT, o que foi associado a aumento nos níveis de oxalacetato e melhora na sensibilidade à insulina. Além disso, aumentou a expressão da PDH em relação aos grupos C e CH, sugerindo aumento da metabolização de carboidratos, que por

sua vez resulta em maior fornecimento de carbonos para o TCA. Esses dados sugerem uma melhora no metabolismo glicolítico/mitocondrial de carboidratos, que pode explicar a melhora na tolerância à glicose observada durante o GTT e na sensibilidade à insulina marcada pelo aumento da fosforilação da Akt em animais normoprotéicos alimentados com HFD e suplementados com TAU (CHT). Entretanto, o fornecimento de carbono para o TCA via reação anaplerótica da PYC em animais RHT parece estar prejudicado, uma vez que TAU não aumentou a expressão dessa enzima em músculo gastrocnêmio de camundongos do grupo RHT. Possivelmente esse quadro está associado ao quadro de intolerância à glicose e de resistência insulina observados nesses animais. Esses dados sugerem que a PYC desempenha um papel fundamental para o metabolismo mitocondrial associado a sensibilidade à insulina, relacionada à flexibilidade metabólica que poderia resultar na melhora da homeostase glicêmica e sinalização da insulina, apesar dessa relação ainda não ter sido investigada. Estudos usando ferramentas farmacológicas ou genéticas, sobre a modulação e atividade dessa enzima, ajudariam responder qual seria, de fato, o seu papel na modulação da sinalização da insulina, diante de situações injuriantes para o metabolismo glicolítico e de lipídios.

### **Conclusão**

Concluimos que HFD induziu resistência muscular à insulina possivelmente por reduzir a expressão da enzima anaplerótica piruvato carboxilase bem como os níveis de oxalacetato independentemente da desnutrição proteica. A suplementação com taurina preveniu a instalação da resistência à insulina através da manutenção da expressão da piruvato carboxilase. A desnutrição proteica associada a obesidade não foi agravante para os efeitos deletérios associados a obesidade, todavia, impediu a ação da taurina sobre esses parâmetros, sugerindo que a programação metabólica induzida por dieta pobre em proteína pode impedir intervenções que visem prevenir ou tratar obesidade e/ou suas co-morbidades.

**Tabela 1 – Composição das Dietas**

<b>Ingredientes (g/Kg)</b>	<b>Normoproteica (14% proteína)</b>	<b>Hipoproteica (6% proteína)</b>	<b>Hiperlipídica (14% proteína)</b>
<b>Caseína</b>	<b>140</b>	<b>47,5</b>	<b>140</b>
<b>Amido</b>	<b>465,7</b>	<b>535,8</b>	<b>115,5</b>
<b>Dextrina</b>	<b>155</b>	<b>178,6</b>	<b>100</b>
<b>Sacarose</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>L-cistina</b>	<b>1,8</b>	<b>0,6</b>	<b>1,8</b>
<b>Fibra (microcelulose)</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Óleo de soja</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>40</b>
<b>Banha</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>312</b>
<b>Mistura de sais AIN93G*</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>
<b>Mistura de vitaminas AIN93G*</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Cloridrato de colina</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>

\* Composição detalhada dada por Reeves et al.,(1993/75).

## Referências

1. Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., Barker, D. J., Hales, C. N., and Bleker, O. P. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**, 173-177
2. Ozanne, S. E., and Hales, C. N. (2002) Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 368-373
3. Hales, C. N., and Barker, D. J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**, 5-20
4. Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R., and Simoneau, J. A. (1999) Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* **277**, E1130-1141
5. Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., and Shulman, G. I. (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**, 664-671
6. Turner, N., and Heilbronn, L. K. (2008) Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab* **19**, 324-330
7. Phielix, E., and Mensink, M. (2008) Type 2 diabetes mellitus and skeletal muscle metabolic function. *Physiol Behav* **94**, 252-258
8. Schrauwen, P., Saris, W. H., and Hesselink, M. K. (2001) An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. *Faseb J* **15**, 2497-2502
9. Schrauwen, P. (2007) High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* **66**, 33-41
10. Hulver, M. W., Berggren, J. R., Cortright, R. N., Dudek, R. W., Thompson, R. P., Pories, W. J., MacDonald, K. G., Cline, G. W., Shulman, G. I., Dohm, G. L., and Houmard, J. A. (2003) Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E741-747
11. Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W., and Shulman, G. I. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**, 50230-50236

12. Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L. P., Li, G., Dobrowsky, R. T., Florant, G. L., and Summers, S. A. (2003) A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* **278**, 10297-10303
13. Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L. P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K. L., Knotts, T. A., Siesky, A., Nelson, D. H., Karathanasis, S. K., Fontenot, G. K., Birnbaum, M. J., and Summers, S. A. (2007) Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* **5**, 167-179
14. An, J., Muoio, D. M., Shiot, M., Fujimoto, Y., Cline, G. W., Shulman, G. I., Koves, T. R., Stevens, R., Millington, D., and Newgard, C. B. (2004) Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* **10**, 268-274
15. Monetti, M., Levin, M. C., Watt, M. J., Sajan, M. P., Marmor, S., Hubbard, B. K., Stevens, R. D., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Sr., Hevener, A. L., and Farese, R. V., Jr. (2007) Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* **6**, 69-78
16. Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., Bain, J., Stevens, R., Dyck, J. R., Newgard, C. B., Lopaschuk, G. D., and Muoio, D. M. (2008) Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* **7**, 45-56
17. Keung, W., Ussher, J. R., Jaswal, J. S., Raubenheimer, M., Lam, V. H., Wagg, C. S., and Lopaschuk, G. D. (2013) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 activity alleviates insulin resistance in diet-induced obese mice. *Diabetes* **62**, 711-720
18. Timmers, S., Nabben, M., Bosma, M., van Bree, B., Lenaers, E., van Beurden, D., Schaart, G., Westerterp-Plantenga, M. S., Langhans, W., Hesselink, M. K., Schrauwen-Hinderling, V. B., and Schrauwen, P. (2012) Augmenting muscle diacylglycerol and triacylglycerol content by blocking fatty acid oxidation does not impede insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11711-11716
19. Wicks, S. E., Vandanmagsar, B., Haynie, K. R., Fuller, S. E., Warfel, J. D., Stephens, J. M., Wang, M., Han, X., Zhang, J., Noland, R. C., and Mynatt, R. L. (2015) Impaired mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3300-3309

20. Schooneman, M. G., Vaz, F. M., Houten, S. M., and Soeters, M. R. (2013) Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes* **62**, 1-8
21. Muoio, D. M., and Koves, T. R. (2007) Lipid-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Novartis Found Symp* **286**, 24-38; discussion 38-46, 162-163, 196-203
22. Koves, T. R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., Dohm, G. L., Yan, Z., Newgard, C. B., and Muoio, D. M. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* **280**, 33588-33598
23. Schrauwen, P., and Hesselink, M. K. (2008) Reduced tricarboxylic acid cycle flux in type 2 diabetes mellitus? *Diabetologia* **51**, 1694-1697
24. Alves, A. P., Damaso, A. R., and Dal Pai, V. (2008) The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *J Pediatr (Rio J)* **84**, 264-271
25. Silvado, C. E., and Werneck, L. C. (2006) Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve* **34**, 72-77
26. Oumi, M., Miyoshi, M., and Yamamoto, T. (2000) The ultrastructure of skeletal and smooth muscle in experimental protein malnutrition in rats fed a low protein diet. *Arch Histol Cytol* **63**, 451-457
27. Escriva, F., Kergoat, M., Bailbe, D., Pascual-Leone, A. M., and Portha, B. (1991) Increased insulin action in the rat after protein malnutrition early in life. *Diabetologia* **34**, 559-564
28. Reis, M. A., Carneiro, E. M., Mello, M. A., Boschero, A. C., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (1997) Glucose-induced insulin secretion is impaired and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 are increased in protein-deficient rats. *J Nutr* **127**, 403-410
29. Toyoshima, Y., Ohne, Y., Takahashi, S. I., Noguchi, T., and Kato, H. (2004) Dietary protein deprivation decreases the serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. *J Mol Endocrinol* **32**, 519-531
30. Gavete, M. L., Martin, M. A., Alvarez, C., and Escriva, F. (2005) Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* **146**, 3368-3378



31. Zhu, M. J., Du, M., Hess, B. W., Means, W. J., Nathanielsz, P. W., and Ford, S. P. (2007) Maternal nutrient restriction upregulates growth signaling pathways in the cotyledonary artery of cow placentomes. *Placenta* **28**, 361-368
32. Lane, R. H., Chandorkar, A. K., Flozak, A. S., and Simmons, R. A. (1998) Intrauterine growth retardation alters mitochondrial gene expression and function in fetal and juvenile rat skeletal muscle. *Pediatr Res* **43**, 563-570
33. Lane, R. H., Kelley, D. E., Ritov, V. H., Tsirka, A. E., and Gruetzmacher, E. M. (2001) Altered expression and function of mitochondrial beta-oxidation enzymes in juvenile intrauterine-growth-retarded rat skeletal muscle. *Pediatr Res* **50**, 83-90
34. Franconi, F., Bennardini, F., Mattana, A., Miceli, M., Ciuti, M., Mian, M., Gironi, A., Anichini, R., and Seghieri, G. (1995) Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr* **61**, 1115-1119
35. De Luca, G., Calpona, P. R., Caponetti, A., Romano, G., Di Benedetto, A., Cucinotta, D., and Di Giorgio, R. M. (2001) Taurine and osmoregulation: platelet taurine content, uptake, and release in type 2 diabetic patients. *Metabolism* **50**, 60-64
36. Cheong, S. H., and Chang, K. J. (2013) Antidiabetic effect of taurine in cultured rat skeletal l6 myotubes. *Adv Exp Med Biol* **775**, 311-320
37. Kim, K. S., Oh da, H., Kim, J. Y., Lee, B. G., You, J. S., Chang, K. J., Chung, H. J., Yoo, M. C., Yang, H. I., Kang, J. H., Hwang, Y. C., Ahn, K. J., Chung, H. Y., and Jeong, I. K. (2012) Taurine ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia by reducing insulin resistance and leptin level in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats with long-term diabetes. *Exp Mol Med* **44**, 665-673
38. Batista, T. M., Ribeiro, R. A., da Silva, P. M., Camargo, R. L., Lollo, P. C., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2013) Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* **57**, 423-434
39. Cappelli, A. P., Zoppi, C. C., Barbosa-Sampaio, H. C., Costa, J. M., Jr., Protzek, A. O., Morato, P. N., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2014) Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. *Liver Int* **34**, 771-783

40. Camargo, R. L., Batista, T. M., Ribeiro, R. A., Branco, R. C., Da Silva, P. M., Izumi, C., Araujo, T. R., Greene, L. J., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2015) Taurine supplementation preserves hypothalamic leptin action in normal and protein-restricted mice fed on a high-fat diet. *Amino Acids* **47**, 2419-2435
41. Vettorazzi, J. F., Ribeiro, R. A., Santos-Silva, J. C., Borck, P. C., Batista, T. M., Nardelli, T. R., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2014) Taurine supplementation increases K(ATP) channel protein content, improving Ca<sup>2+</sup> handling and insulin secretion in islets from malnourished mice fed on a high-fat diet. *Amino Acids* **46**, 2123-2136
42. Ribeiro, R. A., Santos-Silva, J. C., Vettorazzi, J. F., Cotrim, B. B., Mobiolli, D. D., Boschero, A. C., and Carneiro, E. M. (2012) Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. *Amino Acids* **43**, 1791-1801
43. Wuescher, L., Angevine, K., Patel, P. R., and Mensah-Osman, E. (2012) Menin liver-specific hemizygous mice challenged with high fat diet show increased weight gain and markers of metabolic impairment. *Nutr Diabetes* **2**, e34
44. Omar, B., Pacini, G., and Ahren, B. (2012) Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models. *Nutrients* **4**, 1367-1381
45. Shulman, G. I., Rothman, D. L., Jue, T., Stein, P., DeFronzo, R. A., and Shulman, R. G. (1990) Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* **322**, 223-228
46. DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., and Felber, J. P. (1981) The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* **30**, 1000-1007
47. Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A., and Nathan, D. M. (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **346**, 393-403
48. Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., and Uusitupa, M. (2001) Prevention of type

2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* **344**, 1343-1350

49. Gulli, R. A., Tishinsky, J. M., MacDonald, T., Robinson, L. E., Wright, D. C., and Dyck, D. J. (2012) Exercise restores insulin, but not adiponectin, response in skeletal muscle of high-fat fed rodents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R1062-1070

50. de Oliveira, J. C., Grassioli, S., Gravena, C., and de Mathias, P. C. (2012) Early postnatal low-protein nutrition, metabolic programming and the autonomic nervous system in adult life. *Nutr Metab (Lond)* **9**, 80

51. Sharma, N., Sequea, D. A., Arias, E. B., and Cartee, G. D. (2012) Greater insulin-mediated Akt phosphorylation concomitant with heterogeneous effects on phosphorylation of Akt substrates in soleus of calorie-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R1261-1267

52. Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L., and Houmard, J. A. (2000) Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E1039-1044

53. Simoneau, J. A., Veerkamp, J. H., Turcotte, L. P., and Kelley, D. E. (1999) Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *Faseb J* **13**, 2051-2060

54. Heilbronn, L. K., Gan, S. K., Turner, N., Campbell, L. V., and Chisholm, D. J. (2007) Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1467-1473

55. Ritov, V. B., Menshikova, E. V., He, J., Ferrell, R. E., Goodpaster, B. H., and Kelley, D. E. (2005) Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 8-14

56. Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., and Smith, S. R. (2005) A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* **54**, 1926-1933

57. Lionetti, L., Mollica, M. P., Crescenzo, R., D'Andrea, E., Ferraro, M., Bianco, F., Liverini, G., and Iossa, S. (2007) Skeletal muscle

subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1596-1604

58. Jove, M., Salla, J., Planavila, A., Cabrero, A., Michalik, L., Wahli, W., Laguna, J. C., and Vazquez-Carrera, M. (2004) Impaired expression of NADH dehydrogenase subunit 1 and PPARgamma coactivator-1 in skeletal muscle of ZDF rats: restoration by troglitazone. *J Lipid Res* **45**, 113-123

59. Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseane, E., Chauvin, M. A., Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* **118**, 789-800

60. Schmid, G. M., Converset, V., Walter, N., Sennitt, M. V., Leung, K. Y., Byers, H., Ward, M., Hochstrasser, D. F., Cawthorne, M. A., and Sanchez, J. C. (2004) Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics* **4**, 2270-2282

61. Larson-Meyer, D. E., Heilbronn, L. K., Redman, L. M., Newcomer, B. R., Frisard, M. I., Anton, S., Smith, S. R., Alfonso, A., and Ravussin, E. (2006) Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* **29**, 1337-1344

62. Weiss, E. P., Racette, S. B., Villareal, D. T., Fontana, L., Steger-May, K., Schechtman, K. B., Klein, S., and Holloszy, J. O. (2006) Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* **84**, 1033-1042

63. Civitarese, A. E., Carling, S., Heilbronn, L. K., Hulver, M. H., Ukropcova, B., Deutsch, W. A., Smith, S. R., and Ravussin, E. (2007) Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* **4**, e76

64. Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M. O. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314-317

65. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial

function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* **127**, 1109-1122

66. Muoio, D. M., and Neufer, P. D. (2012) Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab* **15**, 595-605

67. Hancock, C. R., Han, D. H., Chen, M., Terada, S., Yasuda, T., Wright, D. C., and Holloszy, J. O. (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7815-7820

68. Muoio, D. M., Noland, R. C., Kovalik, J. P., Seiler, S. E., Davies, M. N., DeBalsi, K. L., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Kheterpal, I., Zhang, J., Covington, J. D., Bajpeyi, S., Ravussin, E., Kraus, W., Koves, T. R., and Mynatt, R. L. (2012) Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab* **15**, 764-777

69. Noland, R. C., Woodlief, T. L., Whitfield, B. R., Manning, S. M., Evans, J. R., Dudek, R. W., Lust, R. M., and Cortright, R. N. (2007) Peroxisomal-mitochondrial oxidation in a rodent model of obesity-associated insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E986-E1001

70. Turner, N., Bruce, C. R., Beale, S. M., Hoehn, K. L., So, T., Rolph, M. S., and Cooney, G. J. (2007) Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* **56**, 2085-2092

71. Ussher, J. R., Koves, T. R., Jaswal, J. S., Zhang, L., Ilkayeva, O., Dyck, J. R., Muoio, D. M., and Lopaschuk, G. D. (2009) Insulin-stimulated cardiac glucose oxidation is increased in high-fat diet-induced obese mice lacking malonyl CoA decarboxylase. *Diabetes* **58**, 1766-1775

72. van Loon, L. J., Koopman, R., Manders, R., van der Weegen, W., van Kranenburg, G. P., and Keizer, H. A. (2004) Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E558-565

73. Goodpaster, B. H., He, J., Watkins, S., and Kelley, D. E. (2001) Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5755-5761

74. van Loon, L. J., and Goodpaster, B. H. (2006) Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* **451**, 606-616
75. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951

## 5) Considerações Finais

Embora tenha sido postulada uma correlação entre a má nutrição, especialmente em fases iniciais do desenvolvimento, com a instalação de doenças metabólicas degenerativas na vida adulta (Hales and Barker, 2013). Nosso grupo de pesquisa, mostrou em trabalhos anteriores que a desnutrição protéica iniciada após o desmame não favoreceu, ou agravou os efeitos deletérios observados em obesidade induzida por dieta rica em gordura (Batista *et al.*, 2013; Cappelli *et al.*, 2014; Vettorazzi *et al.*, 2014; Camargo *et al.*, 2015). Este projeto foi pensado visando encontrar possíveis mecanismos responsáveis por essa discrepância, focando os mecanismos metabólicos envolvidos na modulação da secreção de insulina induzida por glicose, bem como a ação da insulina em tecido muscular esquelético.

Secundariamente e não menos importante, nós mostramos nos trabalhos acima citados, que, apesar da desnutrição proteica associada à obesidade não ter sido um agravante aos efeitos associados a esse quadro de disfunção metabólica, nossos dados acenderam um alerta. Interessantemente, a suplementação com TAU em animais que foram previamente alimentados com uma dieta pobre em proteínas e posteriormente alimentado com dieta rica em gordura, perde completamente seus efeitos sobre a modulação da secreção de insulina, bem como sobre a ação do hormônio. Assim, esse projeto procurou investigar, também, os possíveis mecanismos responsáveis pela ausência de efeitos da TAU, sobre a secreção de insulina, nesse modelo experimental.

Foi proposto que a resistência à insulina é inicialmente compensada com o aumento da secreção do hormônio, a fim de manter a homeostase glicêmica. Todavia, em um cenário onde a resistência à insulina se mantém por um longo período de tempo, as células produtoras de insulina podem entrar em falência, levando a redução de sua função e número, acarretando na instalação do DM2 (Prentki and Nolan, 2006). Nos últimos anos, muito esforço tem sido despendido com o intuito de criar novas estratégias terapêuticas a fim de prevenir ou mesmo tratar as morbidades acima mencionadas (Ahuja and Chou, 2016; Dixon, 2016). Dados de nosso grupo mostraram que a suplementação com TAU é capaz de potencializar os efeitos estimulatórios de nutrientes sobre a secreção de insulina induzida por glicose (Carneiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009), bem como reduz a resistência periférica à insulina em quadro de obesidade (Ribeiro *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2013; Cappelli *et al.*, 2014).

Nesse projeto avaliamos os componentes metabólicos mitocondriais associados à modulação da secreção de insulina estimulada por glicose, bem como a ação deste hormônio

em tecido muscular esquelético. Com base nos dados aqui apresentados, podemos, em resumo, concluir:

- Camundongos desnutridos apresentaram maior sensibilidade periférica à insulina, o que foi associado a maior tolerância à glicose. Esse fenótipo foi confirmado pela maior taxa de fosforilação da AKT em músculo esquelético;
- Dieta rica em gordura induz a instalação da obesidade com suas características associadas em animais que foram previamente desnutridos, todavia, tais animais não são hiperinsulinêmicos em jejum.
- A desnutrição associada à obesidade impediu os efeitos benéficos da suplementação com TAU sobre a homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina;
- Dieta rica em gordura aumentou a secreção de insulina estimulada por glicose de ilhotas pancreáticas isoladas em ambos, animais controles e desnutridos, pelo menos em parte, pela modulação da expressão da PYC e dos níveis de NADPH;
- Em ilhotas pancreáticas a incapacidade da TAU em reverter as alterações induzidas pela dieta rica em gordura em animais desnutridos, se deve, possivelmente pelo baixo nível de expressão do Transportador de TAU, o que reduziu o transporte deste aminoácido para o interior das células;
- Em tecido muscular esquelético, a dieta rica em gordura induziu redução da sensibilidade à insulina e maior acúmulo de TAG;
- Apesar da redução na sensibilidade à insulina em animais desnutridos alimentados com dieta rica em gordura, os níveis de TAG não foram aumentados;
- Em ambos, camundongos controle e desnutridos, a resistência à insulina foi correlacionada com redução nos níveis da PYC e de Oxalacetato, o que pode significar um prejuízo no fluxo de carbonos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos;
- A suplementação com TAU previniu a instalação da resistência muscular à insulina por manter a expressão da PYC e os níveis de Oxalacetato; efeito que foi perdido em animais previamente desnutridos.

Concluimos a partir dos dados aqui apresentados, que o fornecimento de dieta hiperlipídica induz o aumento na secreção de insulina e resistência muscular a este hormônio. A desnutrição proteica, associada à obesidade induzida por dieta, não favoreceu o desenvolvimento de alterações metabólicas e funcionais associadas à síndrome metabólica. Entretanto, a restrição de aminoácidos na dieta impediu os efeitos benéficos da suplementação



com taurina, tanto sobre a modulação da secreção de insulina, bem como sobre a resistência muscular a este hormônio.

A ausência de efeitos da taurina sobre a modulação da secreção de insulina parece estar, pelo menos em parte, associada a alterações na expressão do transportador de taurina, o que resultou em redução do acúmulo deste aminoácido no interior de ilhotas pancreáticas. Essas alterações parecem ser devido a variações nos níveis circulantes de interleucina-6 a qual exerce efeitos sobre a expressão deste transportador.

## 6) Referências Bibliográficas

- ADAMS, S. H. et al. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. **J Nutr**, v. 139, n. 6, p. 1073-81, Jun 2009.
- AHUJA, V.; CHOU, C. H. Novel Therapeutics for Diabetes: Uptake, Usage Trends, and Comparative Effectiveness. **Curr Diab Rep**, v. 16, n. 6, p. 47, Jun 2016.
- ALARCON, C. et al. Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2496-504, Aug 2002.
- AN, J. et al. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. **Nat Med**, v. 10, n. 3, p. 268-74, Mar 2004.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-90, Nov 10 1994.
- ARANTES, V. C. et al. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. **J Nutr**, v. 132, n. 10, p. 3030-5, Oct 2002.
- ASMANN, Y. W. et al. Skeletal muscle mitochondrial functions, mitochondrial DNA copy numbers, and gene transcript profiles in type 2 diabetic and nondiabetic subjects at equal levels of low or high insulin and euglycemia. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3309-19, Dec 2006.
- ATTALI, V. et al. Regulation of insulin secretion and proinsulin biosynthesis by succinate. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5110-8, Nov 2006.
- BATISTA, T. M. et al. Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 3, p. 423-34, Mar 2013.
- BEFROY, D. E. et al. Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1376-81, May 2007.
- BJORNHOLM, M. et al. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. **Diabetes**, v. 46, n. 3, p. 524-7, Mar 1997.
- BRIDGES, C. C. et al. Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 6, p. C1825-36, Dec 2001.
- CAMARGO, R. L. et al. Taurine supplementation preserves hypothalamic leptin action in normal and protein-restricted mice fed on a high-fat diet. **Amino Acids**, v. 47, n. 11, p. 2419-35, Nov 2015.
- CAPPELLI, A. P. et al. Taurine-induced insulin signalling improvement of obese malnourished mice is associated with redox balance and protein phosphatases activity modulation. **Liver Int**, v. 34, n. 5, p. 771-83, May 2014.
- CARNEIRO, E. M. et al. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. **J Nutr Biochem**, v. 20, n. 7, p. 503-11, Jul 2009.
- CHANG, P. Y. et al. Impaired insulin signaling in skeletal muscles from transgenic mice expressing kinase-deficient insulin receptors. **J Biol Chem**, v. 270, n. 21, p. 12593-600, May 26 1995.

CHENG, K. et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates beta cell function in mouse and human islets. **J Clin Invest**, v. 120, n. 6, p. 2171-83, Jun 2010.

CHEONG, S. H.; CHANG, K. J. Antidiabetic effect of taurine in cultured rat skeletal 16 myotubes. **Adv Exp Med Biol**, v. 775, p. 311-20, 2013.

CHOI, C. S. et al. Paradoxical effects of increased expression of PGC-1 $\alpha$  on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19926-31, Dec 16 2008.

CUSI, K. et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J Clin Invest**, v. 105, n. 3, p. 311-20, Feb 2000.

DA SILVA, P. M. et al. Decreased insulin secretion in islets from protein malnourished rats is associated with impaired glutamate dehydrogenase function: effect of leucine supplementation. **Metabolism**, v. 61, n. 5, p. 721-32, May 2012.

DA SILVA, P. M. et al. Preliminary report: leucine supplementation enhances glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. **Metabolism**, v. 59, n. 6, p. 911-3, Jun 2010.

DE BARROS REIS, M. A. et al. Increased L-CPT-1 activity and altered gene expression in pancreatic islets of malnourished adult rats: a possible relationship between elevated free fatty acid levels and impaired insulin secretion. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 2, p. 85-90, Feb 2008.

DE FEYTER, H. M. et al. Increased intramyocellular lipid content but normal skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity throughout the pathogenesis of type 2 diabetes. **Faseb J**, v. 22, n. 11, p. 3947-55, Nov 2008.

DE LUCA, G. et al. Taurine and osmoregulation: platelet taurine content, uptake, and release in type 2 diabetic patients. **Metabolism**, v. 50, n. 1, p. 60-4, Jan 2001.

DE OLIVEIRA, C. A. et al. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1027-34, Apr 2011.

DE ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BORGHI, E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 5, p. 1257-64, Nov 2010.

DEFRONZO, R. A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. **Diabetes**, v. 30, n. 12, p. 1000-7, Dec 1981.

DIXON, J. B. Obesity in 2015: Advances in managing obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 2, p. 65-6, Feb 2016.

ECKERSLEY, R. M. Losing the battle of the bulge: causes and consequences of increasing obesity. **Med J Aust**, v. 174, n. 11, p. 590-2, Jun 4 2001.

EL IDRISSE, A.; BOUKARROU, L.; L'AMOREAUX, W. Taurine supplementation and pancreatic remodeling. **Adv Exp Med Biol**, v. 643, p. 353-8, 2009.

ETO, K. et al. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. **Science**, v. 283, n. 5404, p. 981-5, Feb 12 1999.

FARFARI, S. et al. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 718-26, May 2000.

FILIPUTTI, E. et al. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. **Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 635-44, May 2010.

FRANCONI, F. et al. Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. **Am J Clin Nutr**, v. 61, n. 5, p. 1115-9, May 1995.

FRANSSON, U. et al. Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1578-86, Jul 2006.

FREVERT, E. U.; KAHN, B. B. Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 1, p. 190-8, Jan 1997.

GAO, Z. et al. Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1949-57, May 2003.

GAUTHIER, B. R. et al. PDX1 deficiency causes mitochondrial dysfunction and defective insulin secretion through TFAM suppression. **Cell Metab**, v. 10, n. 2, p. 110-8, Aug 2009.

GOODYEAR, L. J. et al. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2195-204, May 1995.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433-8, Jan 27 2004.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

\_\_\_\_\_. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, v. 60, p. 5-20, 2001.

\_\_\_\_\_. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. **Int J Epidemiol**, v. 42, n. 5, p. 1215-22, Oct 2013.

HANDSCHIN, C. et al. Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1alpha knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3463-74, Nov 2007.

HANSEN, D. B. et al. Downregulation of the taurine transporter TauT during hypo-osmotic stress in NIH3T3 mouse fibroblasts. **J Membr Biol**, v. 245, n. 2, p. 77-87, Feb 2012.

HOFFMANN, E. K.; LAMBERT, I. H. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. **J Physiol**, v. 338, p. 613-25, May 1983.

HOLLAND, W. L. et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. **Cell Metab**, v. 5, n. 3, p. 167-79, Mar 2007.

- IVARSSON, R. et al. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2132-42, Jul 2005.
- JACOBSEN, J. G.; SMITH, L. H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiol Rev**, v. 48, n. 2, p. 424-511, Apr 1968.
- JIANG, L. et al. Activation of PPARdelta promotes mitochondrial energy metabolism and decreases basal insulin secretion in palmitate-treated beta-cells. **Mol Cell Biochem**, v. 343, n. 1-2, p. 249-56, Oct 2010.
- JITRAPAKDEE, S. et al. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1019-32, Jun 2010.
- JONAS, J. C. et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. **J Biol Chem**, v. 274, n. 20, p. 14112-21, May 14 1999.
- KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3-19, Jan 2003.
- KANG, Y. S. et al. Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- $\alpha$ , taurine and hypertonicity. **J Neurochem**, v. 83, n. 5, p. 1188-95, Dec 2002.
- KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185-7, Jan 8 1982.
- KASUGA, M. et al. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. **Nature**, v. 298, n. 5875, p. 667-9, Aug 12 1982.
- KATAGIRI, H. et al. Overexpression of catalytic subunit p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 271, n. 29, p. 16987-90, Jul 19 1996.
- KELLEY, D. E. et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944-50, Oct 2002.
- KIM, K. S. et al. Taurine ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia by reducing insulin resistance and leptin level in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats with long-term diabetes. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 11, p. 665-73, Nov 30 2012.
- LAMBERT, I. H.; HOFFMANN, E. K. Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. **J Membr Biol**, v. 131, n. 1, p. 67-79, Jan 1993.
- LAMBERT, I. H.; JENSEN, J. V.; PEDERSEN, P. A. mTOR ensures increased release and reduced uptake of the organic osmolyte taurine under hypoosmotic conditions in mouse fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 11, p. C1028-40, Jun 1 2014.
- LARSSON, N. G. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **Nat Genet**, v. 18, n. 3, p. 231-6, Mar 1998.
- LEBON, V. et al. Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. **J Clin Invest**, v. 108, n. 5, p. 733-7, Sep 2001.
- LIN, S. et al. Inhibitory effects of taurine on STZ-induced apoptosis of pancreatic islet cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 775, p. 287-97, 2013.

LING, C. et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. **Diabetologia**, v. 51, n. 4, p. 615-22, Apr 2008.

LIU, Y. Q. et al. Enhanced rat beta-cell proliferation in 60% pancreatectomized islets by increased glucose metabolic flux through pyruvate carboxylase pathway. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 3, p. E471-8, Mar 2005.

LIU, Y. Q.; JETTON, T. L.; LEAHY, J. L. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. **J Biol Chem**, v. 277, n. 42, p. 39163-8, Oct 18 2002.

LU, H. et al. The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1434-51, Aug 2008.

MACDONALD, M. J. et al. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 1, p. E1-15, Jan 2005.

MACDONALD, M. J. et al. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 6, p. 1087-91, Jun 2009.

MACDONALD, M. J.; STOKER, S. W.; HASAN, N. M. Anaplerosis from glucose, alpha-ketoisocaproate, and pyruvate in pancreatic islets, INS-1 cells and liver mitochondria. **Mol Cell Biochem**, v. 313, n. 1-2, p. 195-202, Jun 2008.

MACDONALD, M. J.; TANG, J.; POLONSKY, K. S. Low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1626-30, Nov 1996.

MACDONALD, P. E.; SALAPATEK, A. M.; WHEELER, M. B. Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. **J Physiol**, v. 546, n. Pt 3, p. 647-53, Feb 1 2003.

MAECHLER, P. Mitochondrial function and insulin secretion. **Mol Cell Endocrinol**, v. 379, n. 1-2, p. 12-8, Oct 15 2013.

MAECHLER, P.; CAROBBIO, S.; RUBI, B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 5-6, p. 696-709, 2006.

MIHALIK, S. J. et al. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, n. 9, p. 1695-700, Sep 2010.

MOCHIZUKI, T.; SATSU, H.; SHIMIZU, M. Tumor necrosis factor alpha stimulates taurine uptake and transporter gene expression in human intestinal Caco-2 cells. **FEBS Lett**, v. 517, n. 1-3, p. 92-6, Apr 24 2002.

MOLLERUP, J.; LAMBERT, I. H. Phosphorylation is involved in the regulation of the taurine influx via the beta-system in Ehrlich ascites tumor cells. **J Membr Biol**, v. 150, n. 1, p. 73-82, Mar 1996.

\_\_\_\_\_. Calyculin A modulates the kinetic constants for the Na<sup>+</sup>-coupled taurine transport in Ehrlich ascites tumour cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1371, n. 2, p. 335-44, May 28 1998.

MONETTI, M. et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. **Cell Metab**, v. 6, n. 1, p. 69-78, Jul 2007.

MORINO, K.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 55 Suppl 2, p. S9-S15, Dec 2006.

MUOIO, D. M.; KOVES, T. R. Lipid-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle. **Novartis Found Symp**, v. 286, p. 24-38; discussion 38-46, 162-3, 196-203, 2007.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-81, Aug 30 2014.

OBERKOFER, H. et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the transcriptional regulation of the human uncoupling protein 2 gene in INS-1E cells. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 966-76, Feb 2006.

OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Early programming of glucose-insulin metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 9, p. 368-73, Nov 2002.

PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8466-71, Jul 8 2003.

PETERSEN, K. F. et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 350, n. 7, p. 664-71, Feb 12 2004.

PILLAI, R. et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor-1{beta} plays a critical role in maintaining glucose-stimulated anaplerosis and insulin release from pancreatic {beta}-cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1014-24, Jan 14 2011.

POSPISILIK, J. A. et al. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 476-91, Nov 2 2007.

PRENTKI, M.; MATSCHINSKY, F. M.; MADIRAJU, S. R. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. **Cell Metab**, v. 18, n. 2, p. 162-85, Aug 6 2013.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1802-12, Jul 2006.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829-39, Mar 20 1998.

RASSCHAERT, J. et al. Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2631-4, Jun 1995.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-7, Jan 17 1998.

REUSENS, B. et al. The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: prevention by maternal taurine supplementation. **Diabetologia**, v. 51, n. 5, p. 836-45, May 2008.

- RIBEIRO, R. A. et al. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, n. 4, p. 370-9, May 2009.
- RIBEIRO, R. A. et al. Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1791-801, Oct 2012.
- RUDERMAN, N. B. et al. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. E1-E18, Jan 1999.
- SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 507-20, Apr 2007.
- SENER, A.; MERCAN, D.; MALAISSE, W. J. Enzymic activities in two populations of purified rat islet beta-cells. **Int J Mol Med**, v. 8, n. 3, p. 285-9, Sep 2001.
- SENER, A. et al. Nutrient metabolism in pancreatic islets from protein malnourished rats. **Biochem Mol Med**, v. 59, n. 1, p. 62-7, Oct 1996.
- SILVA, J. P. et al. Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. **Nat Genet**, v. 26, n. 3, p. 336-40, Nov 2000.
- SORIANO, S. et al. Reduced insulin secretion in protein malnourished mice is associated with multiple changes in the beta-cell stimulus-secretion coupling. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3543-54, Aug 2010.
- STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 3, p. C565-71, Sep 2004.
- STUMP, C. S. et al. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7996-8001, Jun 24 2003.
- SUMMERMATTER, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} coactivator 1{alpha} (PGC-1{alpha}) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 32793-800, Oct 22 2010.
- SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-7, Jul 4 1991.
- TANTI, J. F. et al. Overexpression of a constitutively active form of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to promote Glut 4 translocation in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 271, n. 41, p. 25227-32, Oct 11 1996.
- THEYS, N. et al. Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 5, p. R1516-25, Nov 2009.
- VETTORAZZI, J. F. et al. Taurine supplementation increases K(ATP) channel protein content, improving Ca<sup>2+</sup> handling and insulin secretion in islets from malnourished mice fed on a high-fat diet. **Amino Acids**, v. 46, n. 9, p. 2123-36, Sep 2014.
- VOSS, J. W. et al. Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 23-24, p. 4646-58, Dec 2004.



WATKINS, D. T. Pyridine nucleotide stimulation of insulin release from isolated toadfish insulin secretion granules. **Endocrinology**, v. 90, n. 1, p. 272-6, Jan 1972.

WATKINS, D. T.; MOORE, M. Uptake of NADPH by islet secretion granule membranes. **Endocrinology**, v. 100, n. 5, p. 1461-7, May 1977.

WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E413-22, Sep 2002.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 10, p. 444-51, Dec 2002.

XU, J. et al. The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 51, n. 11, p. 2022-30, Nov 2008.

YOON, J. C. et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. **Dev Cell**, v. 5, n. 1, p. 73-83, Jul 2003.

YOSHIKAWA, H. et al. Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox. **Metabolism**, v. 50, n. 5, p. 613-8, May 2001.

YOUNGREN, J. F. Regulation of insulin receptor function. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 7-8, p. 873-91, Apr 2007.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 52, p. 50230-6, Dec 27 2002.

ZHANG, D. et al. Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17075-80, Oct 23 2007.

ZOPPI, C. C. et al. Insulin release, peripheral insulin resistance and muscle function in protein malnutrition: a role of tricarboxylic acid cycle anaplerosis. **Br J Nutr**, v. 103, n. 9, p. 1237-50, May 2010.


## Documentos anexos

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desnutrição proteica impede os efeitos da taurina sobre o mecanismo de secreção de insulina induzida por glicose em camundongos obesos: Participação do transportador de taurina**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 08/07/2016

Assinatura :   
Nome do(a) autor(a): **Renato Chaves Souto Branco**  
RG n.º 9485427-0

Assinatura :   
Nome do(a) orientador(a): **Dr. Everardo Magalhães Carneiro**  
RG n.º 6.633.076

## Declaração

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional  
Instituto de Biologia  
UNICAMP

Campinas, 11 de Julho de 2016

A quem essa informação possa vir a interessar.

Eu, Everardo Magalhães Carneiro, professor Titular do Instituto de Biologia da UNICAMP, portador do RG **6.633.076**, declaro que a tese desenvolvida pelo aluno Renato Chaves Souto Branco, portador do RG **9485427-0** e RA **134510**, intitulada **“Desnutrição proteica impede os efeitos da taurina sobre o mecanismo de secreção de insulina induzida por glicose em camundongos obesos: Participação do transportador de taurina”**, corresponde aos dados obtidos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado **“PARTICIPAÇÃO DOS FATORES DE ACOPLAMENTO METABÓLICO SOBRE O PROCESSO DE SECREÇÃO DE INSULINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E OBESIDADE EXPERIMENTAL”**, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UNICAMP (Protocolo: **2827-1**). Declaro ainda, que os resultados obtidos estavam de acordo com o que foi previamente proposto e descrito para o projeto bem como ao que foi descrito durante a solicitação de aprovação perante a CEUA em 2012.

Cordialmente,



---

**Dr. Everardo Magalhães Carneiro**  
Professor Titular do Instituto de Biologia/UNICAMP

Prof. Dr. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO  
Professor Titular - Matrícula 27509-3  
Dep. Biologia Estrutural e Funcional  
Instituto de Biologia / UNICAMP